REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA

VOLUME 1 SETEMBRO, 1941 NÚMERO 3

ESTUDO "IN VITRO" DE ENXERTOS DE CANAIS DEFERENTES DE GATOS EM DIVERSAS CONDIÇÕES HORMONAIS [1]

THALES MARTINS, JOSÉ R. VALLE e ANANIAS PORTO

Instituto Butantan, S. Paulo

(Com 10 figuras no texto)

Em trabalho anterior (1) estudamos o comportamento "in vitro" de enxêrtos de orgãos genitais acessórios de ratos e cobaios e verificamos que a regulação, pelos hormônios sexuais, da contratilidade e da excitabilidade farmacológica daqueles orgãos é sobretudo periférica, isto é, exercida diretamente sobre os orgãos efetuadores.

Continuando na mesma ordem de pesquisas, e demonstradas no gato (2,3) as ações inibidora da testosterona, e excitadora do estradiol sobre a contratilidade dos canais deferentes examinados "in vitro" e "in corpore", procuramos verificar o comportamento dos mesmos orgãos transplantados na parede gástrica, distantes portanto de suas conexões nervosas habituais.

Do estudo comparativo "in vitro" do orgão enxertado e do orgão contralateral mantido na sua sede normal, seria possivel analisar mais a fundo a influência do tratamento prévio dos doadores com os hormônio gonadais. Particularmente interessante, por exemplo, comprovar a ação inibidora da testosterona sobre o orgão transplantado e observar, também neste caso, a influência do tratamento estrogênico, revelada pela sensibilização à pitocina e pela ação inversa da adrenalina. Dada ainda a circunstância de que o orgão passa para um território onde o simpático é inibidor, os resultados poderiam trazer esclarecimentos de alcance geral, na interpretação das questões de mediação química.

MATERIAL E MÉTODO

Serviram de base para este nosso estudo 17 gatos adultos pesando de 2.2 a 4 kg.

OPERAÇÃO — Anestesiado o animal com eter isolavam-se, depois de incisão suprapubiana, o testículo e o cordão esquerdos, secionando-se êste, após liga-

[1] Recebido para publicação a 30 de Maio de 1941.

dura, ao nível da arcada crural. Retirado o testículo era o deferente separado, em placa esteril, dos demais elementos do cordão, exceto os vasos próprios longitudinais, e, depois de ampla incisão abdominal, era êle fixado na serosa gástrica, ao longo da grande curvatura, por meio de três pontos frouxos de catgut. A localização destes pontos dependia do comprimento do deferente a enxertar, em geral 5 cm., e do estado de repleção do estomago.

Fechada a incisão abdominal procedia-se à extirpação do testículo direito e, finalmente, ao fechamento da incisão suprapúbica.

Tratamento — No dia seguinte ao da operação ou no mesmo dia, iniciava-se o tratamento com o propionato de testosterona para assegurar o êxito da enxertia. As doses variaram de 5 a 10 mg. do hormônio em 0.5 a 1 cc. de óleo de sésamo e eram repetidas em injeções subcutâneas com intervalos de 4 a 6 dias. Em 9 gatos depois de 2 a 5 injeções de testosterona foi iniciado o tratamento com o benzoato de estradiol, 0.5 mg. cada 4 ou 6 dias, ou com o dietilestilboestrol de 0.5 a 1 mg. nos mesmos intervalos [2]. Exceção feita de 5 animais mortos durante o tratamento ou em consequência da operação os 12 gatos restantes ficaram assim distribuidos: 5 tratados com testosterona na dose total de 75 a 160 mg. durante 60 a 150 dias; 5 tratados com estradiol, 7 a 10 mg. durante 60 a 90 dias; 2 tratados com estilboestrol, 9 e 10 mg., durante 68 e 84 dias.

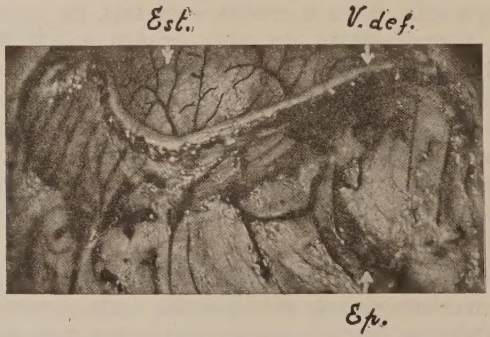


Fig. 1 — Canal deferente enxertado na parede do estômago, acompanhando a grande curvatura.
Abb. 1 — Samenleiter in die Magenwand, längst der grossen Kurvatur, transplantiert.

Miografia — Depois de 60 a 150 dias da operação os animais eram anestesiados com eter e os deferentes — o "in situ" e o transplantado — extirpados, desembaraçados dos demais tecidos adjacentes, e levados para um frasco contendo em média 60 cc. de líquido de Locke oxigenado e à temperatura constante de 37 a 38°. A extremidade livre do deferente era ligada a uma haste inscritora e, as contrações longitudinais eram registradas com ampliação de 1×6 e carga de 1 a 2 g. Colocados os dois orgãos no mesmo frasco em identicas condições experimentais, e registrando-se concomitantemente as contrações de ambos, era possivel uma análise comparativa da motilidade e das reações às drogas ensaiadas. Foram ensaiadas: adrenalina (1:3 a 60 milhões), pitocina (1 a 2 u.i. em 60 cc.), bário (1:30.000 — 1:60.000), histamina (1:600.000 — 1:2.500.000), efedrina (1:30.000 — 1:60.000).

---

[2] Agradecemos o material gentilmente fornecido para a realização destas experiências às Casas Schering (propionato de testosterona, benzoato de estradiol) e Merck (dietilestilboestrol).

RESULTADOS

Os mesmos resultados descritos nos nossos trabalhos anteriores referentes às contrações espontâneas e às reações às drogas foram aqui novamente observados. Tanto o deferente retirado de sua sede habitual quanto o transplantado na parede do estômago, de gatos submetidos ao tratamento pela testosterona foram pouco excitaveis. Êste resultado é valido na comparação dos três grupos experimentais, mas no mesmo grupo, a excitabilidade pode ser maior do orgão enxertado. Em um dos animais tratados com o hormônio masculino o comportamento de ambos os deferentes foi de castrado, isto é, franco automatismo e grande excitabilidade farmacológica. E' provavel que neste caso, por se tratar de longo periodo de castração, o tratamento tenha sido insuficiente.

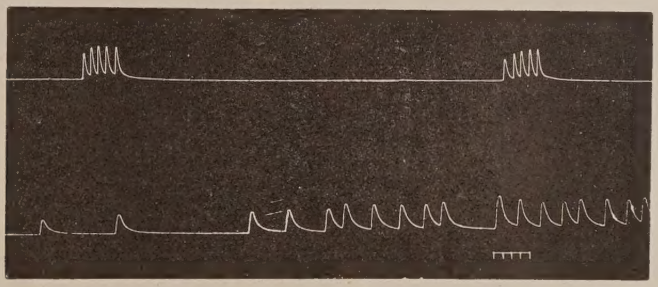


Fig. 2 — Canais deferentes do gato n.º 71, castrado ha 80 dias. Após 5 injeções de 5 mg. de Propionato de Testosterona, durante 20 dias, foi tratado com 7 mg. de Benzoato de Estrádio, durante 60 dias. Em cima, deferente retirado de sua séde habitual; em baixo, deferente enxertado na parede gástrica. Automatismo. Tempo em todas as figuras: 6 segundos.

Abb. 2 — Samenleiter "in vitro" der Katze 71, 80 Tage nach der Kastration. Nach 5 Injektionen von Testosteron-propionat (5 mg in 20 Tagen), wurde mit 7 mg Oestradiolbenzoat (auf 60 Tage verteilt) behandelt. Oben: Samenleiter, der "in situ" belassen war; unten: in die Magenwand transplantierter Samenleiter. Automatie. Zeit bei allen Abbildungen 6 sek.

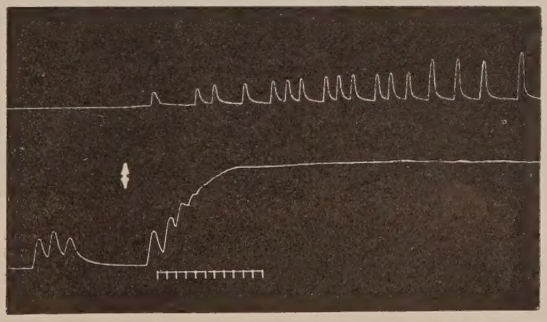
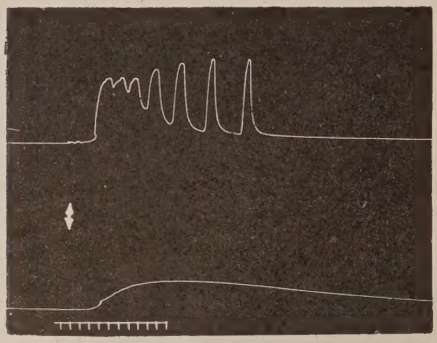


Fig. 3 — Os mesmos orgãos da figura anterior. Adição ao banho de cloridrato de cocaina a 1:30.000.

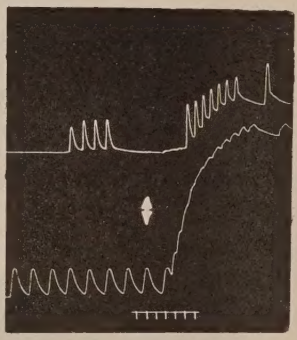
Abb. 3 — Dieselben Organe wie in Abb. 2. Zugabe von Cocainchlorhydrat (1:30.000).

O comportamento dos dois orgãos provenientes de doadores tratados com substâncias estrogênicas foi perfeitamente comparavel. Assim

tanto o orgão enxertado como o contralateral, mantido na sua sede normal, apresentaram automatismo, reação inversa à adrenalina e sensibilisação à pitocina. E' verdade que, algumas vezes, o orgão enxertado além de se mostrar mais excitavel, apresentava contrações predomi-



4



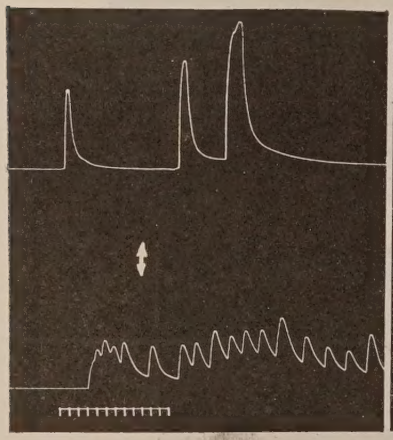
5

Fig. 4 — Os mesmos orgãos da figura anterior. A sete indica a adição de 2 U.I. de Pitocina.

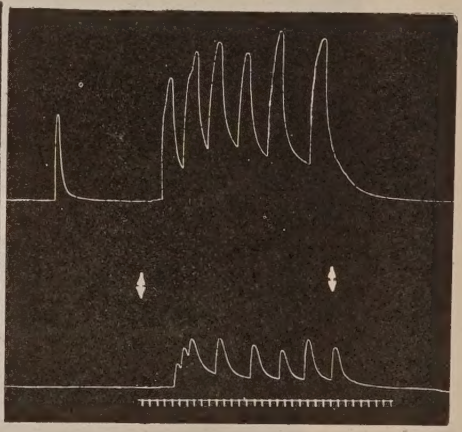
Abb. 4 — Dieselben Organe wie in Abb. 2. Zugabe von 2 I.E. Pitocin.

Fig. 5 — Os mesmos orgão da figura anterior. Adição ao banho de Dicloridrato de Histamina a 1:2.500.000.

Abb. 5 — Dieselben Organe wie in Abb. 2. Zugabe von Histamin-chlorhydrat (1:2.500.000).



6



7

Fig. 6 — Canais deferentes do gato n.º 72, castrado ha 84 dias. Após 5 injeções de 5 mg. de Testosterona, em 15 dias, foi tratado com 10 mg. de Dietilestilboestrol, durante 69 dias. Em cima, deferente retirado de sua séde habitual; em baixo, deferente enxertado na parede gástrica. Adição ao banho de 1 U.I. de Pitocina.

Abb. 6 — Samenleiter der Katze 72, 84 Tage nach der Kastration. Nach 5 Injektionen von Testosteron (5 mg in 15 Tagen) wurden die Tiere mit 10 mg Diäthylstilboestrol (in 69 Tagen verabreicht) behandelt. Oben: Samenleiter, der "in situ" belassen war; unten: in die Magenwand transplantierter Samenleiter. Zugabe von Pitocin (1 I.E.).

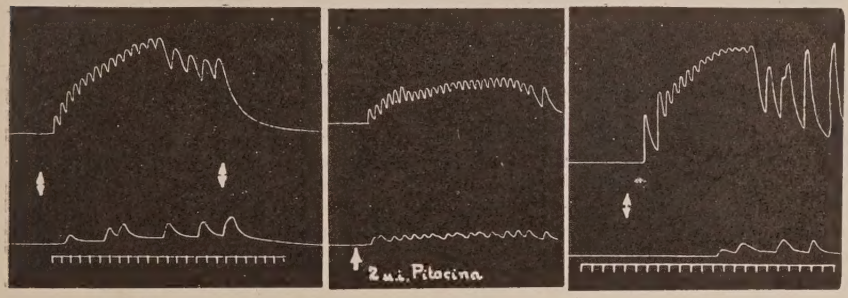
Fig. 7 — Os mesmos orgãos da figura anterior. A 1ª seta indica a adição ao banho de Histamina a 1:2.500.000. A 2ª seta indica a junção, ao mesmo banho, de cloridrato de adrenalina a 1:2.500.000.

Abb. 7 — Dieselben Organe wie in Abb. 6. Erster Pfeil Zugabe von Histamin (1:2.500.000); zweiter Pfeil zugabe von Adrenalin-chlorhydrat (1:2.500.000).

nantemente tônicas quando, no grupo estradiol domina a resposta rítmica. A ação inibidora da adrenalina ficou patente, neste grupo experimental, tanto sobre as contrações espontâneas como depois do emprego de drogas excitantes como a histamina e o bário.

DISCUSSÃO

A conclusão dominante das experiências aqui descritas é que a ação reguladora dos hormônios sexuais sobre a motilidade da genitália masculina do gato também se exerce sobre os orgãos transplantados, isto é, livres das suas conexões nervosas normais. Apesar das boas condições do enxerto, quér sob o ponto de vista morfológico, macro e microscópico, quér sob o ponto de vista funcional pois verificamos a sua



8 9 10

Fig. 8 — Deferentes do gato n.º 70, castrado de 68 dias. Após 4 injeções de 5 mg. de propionato de testosterona, em 11 dias, foi tratado, durante 57 dias, com 9 mg. de dietilestilboestrol. Ao alto, deferente retirado de sua séde habitual. Em baixo, deferente enxertado na parede gástrica. A 1ª flecha indica a adição ao banho de Histamina a 1:1.200.000. A 2ª seta, marca a junção ao mesmo banho de cloridrato de adrenalina a 1:2.500.000.

Abb. 8 — Samenleiter der Katze 70, 68 Tage nach der Kastration. Nach 4 Injektionen von 5 mg Testosteron-propionat (in 11 Tagen verabreicht) wurden dem Tier in 57 Tagen 9 mg. Diäthylstilboestrol gegeben. Oben: Der "in situ" belassene Samenleiter; unten: der in die Magenwand transplantierte Samenleiter. Erster Pfeil: Zugabe von Histamin (1:1.200.000). Zweiter Pfeil: Zugabe von Adrenalin-chlorhydrat (1:2.500.000).

Fig. 9 — Os mesmos orgãos da figura anterior. A seta indica a adição ao banho de 2 U.I. de Pitocina.

Abb. 9 — Dieselben Organe wie in Abb. 8. Zugabe von 2 I.E. Pitocin.

Fig. 10 — Deferentes do gato n.º 53, castrado 68 dias antes e tratado com 160 mg. de propionato de testosterona repartidos em 16 injeções. Em cima, deferente retirado de sua séde normal; em baixo, deferente enxertado. Adição ao banho de adrenalina na concentração de 1:1.600.000.

Abb. 10 — Samenleiter der Katze 53, 68 Tage nach der Kastration und mit 160 mg Testosteron-propionat, was auf 16 Injektionen verteilt war, behandelt. Oben: Der "in situ" belassene Samenleiter; unten: der in die Magenwand transplantierte Samenleiter. Zugabe von Adrenalin (1:1.600.000).

motilidade e excitabilidade farmacológica, nada podemos deduzir da sua inervação. O método usado de impregnação pela prata não revelou a presença de filetes nervosos, tão abundantes nos orgãos "in situ". Não acreditamos, sobretudo nos enxêrtos antigos, não existirem fibras nervosas pelo menos acompanhando os vasos neoformados. Mesmo admitindo a existência delas devemos aceitar que a sua presença não modificou o comportamento farmacológico do enxêrto ou porque a regulação hormonal se faz diretamente sobre a própria fibra muscular

ou porque o filete simpático originário de tronco inibidor tenha sempre função excitadora ao chegar no deferente, não importando o tratamento hormonal do portador. É, como se vê, uma questão interessante; restaria analisar o comportamento "in corpore" do orgão enxertado depois da excitação simpática e vagal e da injeção endovenosa de adrenalina.

A influência do tratamento pelo estilboestrol foi a mesma do estradiol. E' este mais um exemplo de aproximação das duas substâncias. Convém referir entretanto que um dos animais tratados apresentou no final do tratamento um sindromo de retenção biliar aguda com distensão da vesícula e dos canais biliares. Temos presentemente outros gatos em tratamento para ser decidido si êstes fenômenos foram mera coincidência ou resultado do emprego daquele estrogênico sintético.

RESUMO

Foram estudados concomitantemente "in vitro" canais deferentes enxertados na parede gâstrica e os contralaterais retirados de sua sede normal, de gatos castrados e tratados com hormônios sexuais. A regulação hormonal da contratilidade destes orgãos ficou patente também nos transplantados. A testosterona exerce ação inibidora e o estradiol ação excitadora. O tratamento estrogênico, tanto pelo estradiol como pelo estilboestrol, sensibilisou os orgãos à ação da pitocina e inverteu os efeitos da adrenalina. O deslocamento dos efetuadores, pelo menos nas condições descritas, não interferiu na contratilidade e na excitabilidade farmacológica reguladas pelos hormônios sexuais.

ZUSAMMENFASSUNG

Als Fortsetzung früherer Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass die Kontraktilität der akzessorischen männlichen Geschlechtsorgane unter dem Einfluss der Sexualhormone steht, wurde untersucht, ob diese hormonale Wirkung durch oder ohne das Nervensystem ausgeübt wird. Verff. haben daher vergleichende Untersuchungen in vitro an solchen Samenleitern, die in die Magenwand verpflanzt und an solchen, die "in situ" belassen waren, gemacht. Frühere, an Ratten und Meerschweinchen durchgeführte Versuche (1) wiesen nämlich darauf hin, dass sich die funktionale Wirkung von Testosteron oder Oestradiol auch an transplantierten Organen nicht ändert.

In dieser Veröffentlichung sind an Katern gewonnene Versuchsergebnisse beschrieben. Schon früher haben die Verff. gezeigt, dass sich die Samenleiter von Katern "in vitro", je nach dem hormonalen Zustand des Versuchstieres, verschieden verhalten. Die in Lockeschen Lösung gehaltenen Samenleiter von normalen oder von kastrierten und mit Testosteron behandelten Tieren zeigen keine Automatie und sind den verschiedenen Chemikalien gegenüber weniger empfindlich. Die kastrierten und mit Oestradiol behandelten Tiere weisen dagegen Automatie und eine grosse pharmakologische Reaktionsfähigkeit auf. Was die Wirkung von Hormonen anbelangt, gibt es noch einen interessanten Unterschied, indem Adrenalin an den Organen von testosteron-kastrierten Tieren Kontraktion und an den von Oestradiol-kastrierten Erschlaffung hervorruft. Ausserdem sensibilisiert das Oestradiol das Organ gegenüber der Wirkung von Pitocin.

Um diese hormonale Kontrolle näher zu analysieren, untersuchten Verff. das pharmakologische Verhalten der in den Magen verpflanzten Samenleiter.

Von jedem Tier wurde der eine Samenleiter in die Magenwand transplantiert und der andere auf seiner norm. Stelle belassen, gleichzeitig wurden die Testikel entfernt. Zwecks Erleichterung des Einheilens wurde den Tieren 10-20 Tage hindurch Testosteron (subcutan) gegeben. Nachher wurden die Kater in 3 Gruppen verteilt. Die eine Gruppe hat weiter Testosteron bekommen, der anderen wurde Oestradiol-benzoat und der dritten nur Diäthylstilboestrol verabreicht. 60-150 Tage nach der Operation wurden beide (der "in situ" belassene und der verpflanzte) Samenleiter entfernt und in das gleiche Gefäss mit Lockescher Lösung gebracht um die Längskontraktionen und die Wirkung von Pharmaka graphisch aufnehmen zu können. Die transplantierten Samenleiter sämtlicher Versuchsgruppen haben eine Neigung zu tonischen Kontraktionen gezeigt, jedoch die Beobachtungen, die als die wichtigsten zu bezeichnen sind, waren: Automatie, Erregbarkeit durch Chemikalien und Reaktion Pitocin und Adrenalin gegenüber.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass zwischen dem Verhalten von verpflazten und "in situ" Organen keine merklichen Unterschiede in vitro bestehen; beide verhalten sich entsprechend der Hormonbehandlung. Die Testosteron-Tiere wiesen eine geringere Reizbarkeit auf Drogen, Fehlen von Automatie und Ausbleiben der Pitocinvirkung; Adrenalinruft Kontraktion hervor. Die mit oestrogenen Substanzen (Oestradiolbenzoat, Diäthylstilboestrol) behandelten Tiere besitzen dagegen Automatie, zeigen eine erhöhte Reizbarkeit und Adrenalin wirkt bei denen hindernd. Die Versuche zeign also, dass durch die Verpflanzung des Organs von der normalen nach entfernter Stelle die Wirkung der sexuellen Hormone nicht beeinflusst wird, woraus folgt, dass dieselbe ohne die Beihilfe der spezifischen Nervenzentren ausgeübt wird.

CITAÇÕES

1. MARTINS, T., VALLE, J. R. & PORTO, A., 1940, Estudo morfologico e funcional de enxertos de orgãos genitais acessorios de ratos e cobaios em diversas condições hormonais. *Mem. Inst. Butantan,* 14: 137-147.

2. MARTINS, T. & VALLE, J. R., 1939, Influence des hormones sexuelles sur la contractilité du canal déférent du chat "in vitro". Inversion des effets de l'adrénaline; sensibilization à la pituitrine. *C. R. Soc. Biol., Paris,* 130: 189-192.

3. MARTINS, T. & VALLE, J. R., 1940, Vergleichende Pharmakologie "in vitro" der Samenleiter normaler, kastrierter und mit Sexualhormonen behandelter Katzen. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.,* 243 (3): 243-258.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 249-251
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

NOVO TREMATÓDIO PARASITO DE PEIXE DO RIO MIRANDA [1]

J. F. TEIXEIRA DE FREITAS
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 3 figuras no texto)

Recentemente publicamos um artigo no qual foi descrita uma nova espécie pertencente ao gênero *Creptotrema* Travassos, Artigas & Pereira, que denominamos *C. dissimilis* (Novo trematodio parasito de peixe de agua doce, *Mem. Inst. Osw. Cruz,* 35 (3): 569-570, 1 est., 8 figs.).

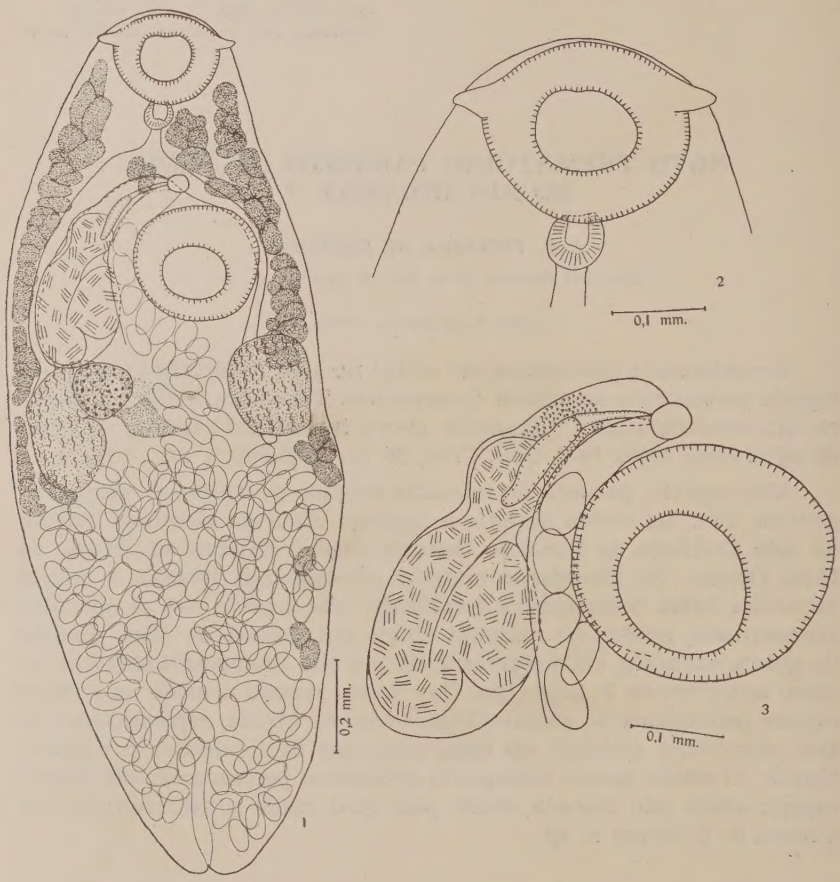
Esta espécie, parasita do intestino delgado de *Tetragonopterus argenteus* Cuv., foi obtida durante a segunda excursão científica realizada pela Comissão do Instituto Oswaldo Cruz à Salobra, no Estado de Mato Grosso. No abundante material coletado nas terceira e quarta excursões feitas nesta mesma localidade, esta espécie não se encontra representada, porém, no material obtido em Janeiro de 1941, quando da quinta excursão, ela é representada por oito exemplares colhidos em cinco autópsias de *T. argenteus* Cuv. Nesta mesma ocasião uma outra espécie pertencente ao gênero *Creptotrema* foi obtida, representada por tres exemplares colhidos em duas autópsias de *Chalcinus paranensis* Gunth. O estudo destes exemplares evidenciou pertencerem êles a uma espécie ainda não descrita, razão pela qual agora a descrevemos com o nome de *C. dispar* n. sp.

Creptotrema dispar n. sp.
(Figs. 1-3)

Corpo mais ou menos alongado, com 1,81 mm. de comprimento por 0,67 mm. de largura. Cutícula lisa. Ventosa oral subterminal, com 0,19 mm. de comprimento por 0,23 mm. de largura, possuindo, em sua porção mais anterior e externa, duas saliências papiliformes, dirigidas para fora. Acetábulo pré-equatorial, um pouco maior que a ventosa oral, com 0,26 mm. de comprimento por 0,27 mm. de largura. Faringe presente, musculoso, com 0,06 mm. de diâmetro. Esôfago curto, com 0,10 mm. de comprimento. Cecos intestinais mais ou menos delgados, terminando ao nivel da zona equatorial do corpo. Poro genital pré-

[1] Recebido para publicação a 30 de Maio de 1941.

acetabular, submediano, bifurcal. Bolsa do cirro grande, ultrapassando a borda posterior do acetábulo, contendo cirro, região prostática e vesícula seminal muito desenvolvida e dobrada, e medindo cerca de 0,48 mm. de comprimento por



Creptotrema dispar n. sp. — Fig. 1: Aspeto total; fig. 2: ventosa oral; fig. 3: região da bolsa do cirro.

0,19 mm. de maior largura. Testículos post-acetabulares, situados na mesma zona e em campos afastados, ocupando as áreas cecais, intracecal e extracecais, medindo 0,23 a 0,26 mm. de comprimento por 0,16 a 0,17 mm. de largura. Ovário situado na região anterior da zona testicular, arredondado, com campo parcialmente superposto ao de um dos testículos, intracecal, lateral, medindo 0,12 mm. de comprimento por 0,13 mm. de largura. Espermateca presente, pouco nítida, intracecal, situada na zona testicular e em parte na área ovariana. Glândula de Mehlis presente, intracecal, situada ao lado do ovário e logo atrás da espermateca, medindo 0,078 mm. de comprimento por 0,096 mm. de largura. Canal de Laurer não evidenciado. Vitelinos constituidos por folículos bem desenvolvidos, extracecais, extendendo-se da zona da ventosa oral até a região equatorial do corpo, podendo, entretanto, possuir alguns folículos post-equatoriais,

não constantes. Útero post-glandular, ocupando toda a região posterior do corpo. Ovos amarelados, operculados, relativamente grandes, com 0,080 mm. de comprimento por 0,046 mm. de largura. Vesícula excretora constituida por um ramo simples. Poro excretor terminal.

Habitat — Divertículos pilóricos de *Chalcinus paranensis* Gunth.

Proveniência — Rio Miranda, Salobra, Estado de Mato Grosso, Brasil.

Tipo e paratipos na coleção helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz.

Examinamos desta espécie um exemplar inteiro, medido e desenhado, considerado como tipo, e dois outros, fragmentados.

Creptotrema dispar n. sp. aproxima-se de *C. dissimilis* Freitas, 1941, porém facilmente dela se distingue pela posição dos vitelinos, além de vários outros caracteres.

ABSTRACT

The author describes *Creptotrema dispar,* new trematode-species from fresh-water fish. It resembles *C. dissimilis* Freitas, 1941, but differs, principally, by the disposition of the vitellaria.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 253-262
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

TAXA DE AMÔNIA DO SANGUE DE CÃES COM NEFRITE URÂNICA E APÓS NEFRECTOMIA BI-LATERAL [1]

HILARY KOPROWSKI e HIRSZ UNINSKI [2]

(Com 2 figuras no texto)

A amônia do sangue é o produto mais simples da desaminização proteica no organismo. Não é o último porquanto o fígado e provavelmente outros orgãos sintetizam a uréia a partir da amônia.

ARTOM supõe que todos os orgãos do corpo humano, principalmente o fígado, o timus, os rins e os músculos produzam amônia, mas experiências (CONWAY) demonstraram que apenas 4 das 51 substâncias adicionadas, isto é, adenosina, ácido adenílico (dos músculos e do levedo de cerveja), adenil trifosfato e ácido nucleico do timus, aumentam a quantidade de amônia no sangue extravasado pela sangria, substâncias essas que podem ser consideradas como produtoras de amônia.

A ação acidificante da amônia no corpo, quando ministrada oralmente, foi provada por VENULET, GOEBEL & TISLOWITZ, e seu mecanismo explicado por PARNAS como estritamente associado à secreção do estômago. A amônia ministrada por todas as outras vias tem pouca influência no pH do sangue.

Os rins têm sido considerados como a principal fonte da amônia do sangue desde as clássicas experiências de NASH & BENEDICT, que trabalhando segundo método próprio verificaram ser a taxa de amônia na veia renal duas vêzes maior que a da artéria renal. Esta hipótese "clássica" sobre a formação de amônia foi aceita e tem sido mantida por diversos pesquisadores (GOTTLIEB, CHOLOPOFF) mas recentemente surgiram dúvidas quanto à existência de amônia livre no sangue, e quanto à possibilidade de ainda se poder considerar os rins como os únicos ou pelo menos como os principais orgãos produtores de amônia.

A primeira questão depende absolutamente dos métodos de determinação da amônia no sangue e a consideraremos descrevendo o processo de CONWAY. A segunda é de importância primordial. As primei-

[1] Recebido para publicação a 4 de Julho de 1941.
[2] Ex-assistentes do Instituto de Patologia Geral e Experimental da Universidade "Joseph Pilsudski" de Varsóvia, Polônia.

ras vacilações sobre a produção de amônia pelos rins, foram expressas por Przylecki que admite para estes orgãos apenas a capacidade de concentrar amônia negando-lhes a de produzí-la.

Contrárias à hipótese de Nash & Benedict têm sido as determinações de amônia na nefrite urânica experimental (Steel & Kunzova) e na nefrite pelo sublimado (Bang) quando, na ocurrência de lesão do parênquima renal, a taxa de amônia do cérebro aumentou e a excreção se apresentou muito diminuida.

Tambem Fuld determinando a amônia do sangue na uremia encontrou valores mais altos (0,259 mg % de NH_3-N). Em oposição a este resultado Evtoukova & Janovsky encontraram nivel normal de amônia no sangue de coelhos intoxicados por sublimado.

O objetivo do presente trabalho foi a investigação da influência da nefrectomia bi-lateral e da nefrite urânica sobre a amônia do sangue, tendo-se desse modo procurado resolver a questão si ainda se pode encarar os rins como os principais orgãos produtores de amônia.

As determinações de uréia não foram realizadas por estar fora de cogitações que o N da uréia aumenta na nefrite experimental assim como na nefrectomia (Feyel, Bussel & Bowman).

MÉTODOS

O processo de determinação da amônia no sangue tem uma longa história. Depois das primeiras experiências de Nencki & Zaleski (1901) muitos outros métodos de muito maior precisão foram divulgados. Com essa conquista foi verificado que os valores de NH_3 encontrados no sangue são muito baixos, chegando-se mesmo recentemente a duvidar da existência de amônia livre no sangue em circulação.

Parnas, empregando método próprio, provou em animais que a amônia livre existente no sangue em circulação, está num nivel de 40 γ/100 cc. Conway, tambem baseado em processo próprio, mostrou que no homem e no coelho a taxa de NH_3 do sangue em circulação é ou zero ou abaixo do nivel analizavel, sendo assim a amônia formada muito rapidamente depois da sangria.

Considerando que no método de Parnas a determinação de amônia é feita cerca de 4 minutos depois da sangria, e que no de Conway o é imediatamente após, sendo o nivel de amônia no sangue estravasado, no 4.º minuto, o mesmo que o encontrado por Parnas (40 γ/100 cc.), podemos afirmar não haver diferença essencial nas conclusões de ambos.

A superioridade do método de Conway fica claramente patenteada pela possibilidade de se fazer uma série de determinações depois da sangria.

A fáse imediata de elevação da taxa de amônia no sangue depois da sangria e terminando dentro de 5 minutos foi denominada Amônia *"alfa"* (Conway & Cooke). A Amônia *"beta"* é formada lentamente no sangue 5 minutos após a sangria até 3-5 horas. O período *"gama"* termina dentro de 24 horas posteriores à sangria.

No atual trabalho, tal como observamos na publicação anterior (1939), tomamos a Amônia *"alfa"* como a mais característica para a determinação da amônia no sangue. Portanto as determinações foram feitas dentro de 5 minutos após a sangria e no 10.º minuto.

EXPERIÊNCIAS

Todas as experiências foram feitas com cães de grande porte pesando de 18 a 22 quilos. Após a determinação da curva normal de formação de NH_3, 4 dos animais (A, C, E, G) foram nefrectomizados sob anestesia geral por injeção intravenosa de uma solução de cloralose. Amostras de sangue foram colhidas 2 horas depois da operação, 24, 48, 72, 120 horas e assim por diante até a morte dos animais. Os animais sucumbiram, tendo recusado alimento sólido (durante todo o período após a operação) e ingerido apenas agua, principalmente entre 48 e 120 horas depois da nefrectomia.

Em cinco outros cães (B, D, F, H, I) injetou-se hipodermicamente uma solução em agua distilada de nitrato de uranio (7 mg./Kg. de peso). A determinação foi feita no 7.º dia após a injeção quando surgiram os primeiros sintômas de envenenamento (convulsões violentas e vômitos) e no 10.º dia antes da morte do animal. Foram submetidos à autópsia comum e ao exame histopatológico os fígados e rins atacados de nefrite e o fígado dos cães nefrectomizados.

Houve duas formas de contrôle: um cão ficou em jejum (com abundância de agua) durante 72 horas sendo as determinações da amônia no sangue levadas a cabo 72 horas depois do início da privação de alimento; o outro cão

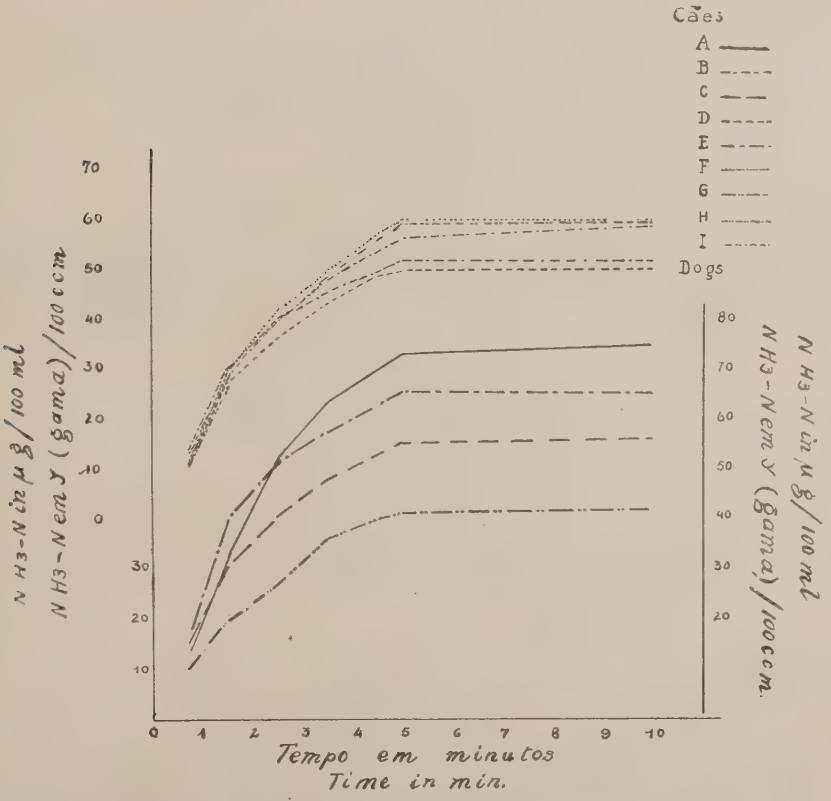


Fig. 1 — Taxa de amônia no sangue de cães após sangria. Amonia content of canine blood after shedding.

foi anesteziado com solução de cloralose e as determinações de NH_3 do sangue realizadas 2 horas e 24 horas depois da administração do anestésico.

RESULTADOS

Taxa de amônia no sangue normal de cães — A figura 1 mostra que, da mesma forma que no homem (Conway) e no coelho (Conway & Cooke) a taxa de NH_3 no sangue circulante dos cães é zero ou inferior ao nivel analisavel. No sangue dos cães temos a mesma elevação característica imediatamente após a sangria e terminando dentro de 5 minutos (Amônia *"Alfa"*) sendo NH_3 então formada muito lentamente. A curva de formação de NH_3 extrapolarizada para zero tempo após a sangria, passa através a origem. A única diferença entre o sangue de cães e do homem quanto à taxa e a formação de NH_3 é que a taxa de NH_3 no primeiro é um pouco mais alta no 5.º minuto, sendo 50/75 γ — NH_3 — N/100 cc. ao invés de 40-50 γ/100 cc. como ocorre no último. Estes resultados confirmaram nossas observações anteriores (1939).

Taxa de amônia no sangue de cães após nefrectomia bi-lateral — Os resultados obtidos com os 4 cães estão resumidos na Tabela 1 e na figura 2. A tabela dá os valores médios da NH_3 do sangue 2 horas após a nefrectomia e pouco tempo antes da morte do animal.

TABELA I

CÃES NEFRECTOMIZADOS (A, C, E, G)

Tempo após a nefrectomia	*Taxa média de NH_3 do sangue (γ N/100 cc.) analizada após execução da sangria*			*Formação observada de NH_3 na sangria γ N/100 cc.*	
Horas	0,75 min. depois	5 min. dep.	10 min.dep.	Após 5 min.	Após 10 min.
2	20,8	76,5	78,7	55,3	57,9
Antes da morte A — 72 C — 48 E — 120 G — 72	454,4	547,4	548,6	93,0	94,2

Os algarismos indicativos da NH_3 do sangue referem-se à análise feita imediatamente (0,75 min.) depois da sangria e após 5 e 10 mi-

nutos respectivamente. O gráfico representa a curva dos valores médios de amônia no sangue de cada cão em períodos regulares após a ne-

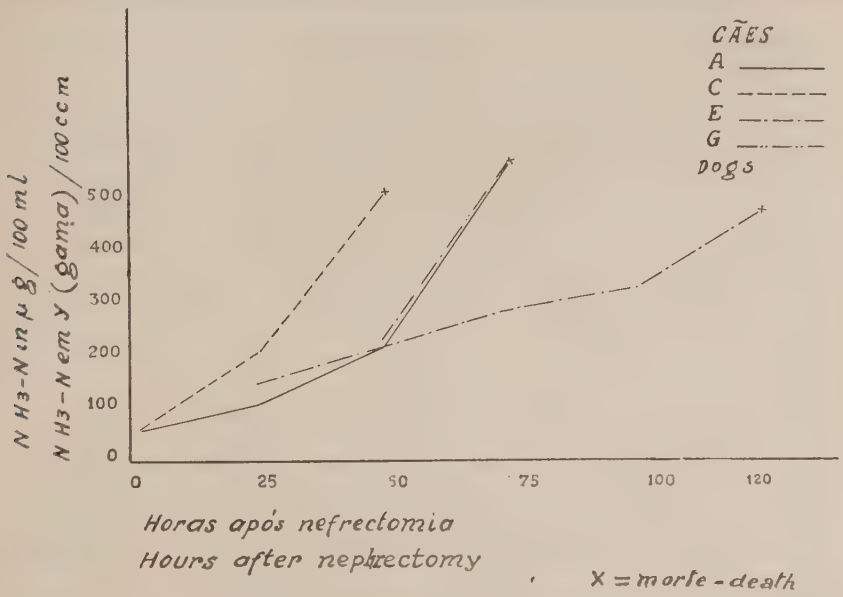


Fig. 2 — Taxa de amônia no sangue de cães após nefrectomia. Amonia content of canine blood after nephrectomy.

frectomia. Pode-se observar que a elevação da amônia no sangue após a nefrectomia é lenta no primeiro período, erguendo-se bruscamente a curva, cerca de 24 horas antes da morte do animal. O máximo do aumento de NH_3 no sangue necessariamente ocorre pouco antes da morte, momento em que se apresenta o valor médio de 454,4 γ NH_3 — N/100 cc. como determinado após a sangria.

Taxa de amônia no sangue na nefrite urânica — Foram apresentados valores sobre 5 cães. Esses mostram uma diferença bastante acentuada dos gráficos após a nefrectomia. A NH_3 aumenta lentamente de modo que — demonstrado na Tabela II — atinge tambem seu máximo no dia da morte do animal (10 dias), sendo os valores médios muito mais baixos (299,4 NH_3-N/100 cc., como analisado 0,75 minutos após sangria) do que os verificados após a nefrectomia.

Elevação de "alfa" em alta concentração de amônia no sangue — As últimas 2 colunas das Tabelas I e II resumem os dados necessários, dando os acréscimos nos períodos de 5 e 10 minutos sobre as concentrações obtidas imediatamente após a sangria (0,75 minutos).

Resulta do exposto nas Tabelas que tal aumento de NH_3 no sangue ocorre em todos os niveis — a se julgar pelos valores médios — e que chega a um fim após 5 minutos.

TABELA II

CÃES ATACADOS DE NEFRITE URÂNICA (B, D, F, H, I)

Tempo após injeção de Nitrato de Urânio 7 mg/Kg. peso	*Taxa média de NH_3 do sangue (γ N/100 cc.) analizada após execução da sangria*			*Formação observada de NH_3 na sangria γ N/100 cc.*	
Dias	0,75 min. depois	5 min. dep.	10 min. dep.	Após 5 min.	Após 10 min.
7	185,8	243,8	246,0	58,0	60,2
10	290,4	354,9	357,2	55,5	57,8

A taxa desta formação não é influenciada de modo algum definitivo pelo nivel inicial da NH_3 do sangue. Como se pode ver na última coluna da Tabela I, a taxa varia a medida que NH_3 do sangue aumenta, porém apenas o erro experimental poderá ser a causa de variações acentuadas.

Contrôles — A taxa de NH_3 no sangue de cães em jejum é aumentada como o demonstrado na Tabela III, sendo os valores (54,0 γ N/100 cc., como determinado 0,75 minutos depois da sangria) cerca de tres vezes maiores que os normais. Isto já foi observado no sangue dos coelhos por Parnas & Klisiecki.

TABELA III

CONTRÔLE

CÃES EM JEJUM (SEM ALIMENTOS)

	Taxa de NH_3 do sangue (γ N/100 cc.) analizado após realização da sangria		
	0,75 min. depois	5 min. dep.	10 min. dep.
Antes da experiência	14,3	52,1	52,7
72 horas de jejum	54,0	92,2	96,7

Não ha aumento de amônia no sangue após anestesia (Tabela IV), sendo a pequena variação causada por erro experimental.

TABELA IV

CONTRÔLE

INFLUÊNCIA DE ANESTÉSICOS (CLORALOSE)

Tempo após injeção de cloralose	*Taxa de NH_3 do sangue (γ N/100 cc.) analizado após realização da sangria*		
Horas	0,75 min. depois	5 min. dep.	10 min. dep.
0	8,7	56,0	57,0
2	11,3	69,0	69,9
24	10,4	57,8	59,4

Resultados histopatológicos — Nos cães A, B, C, E, G, o exame do fígado deu em resultado a verificação de hiperemia muito acentuada. No cão B, foram examinados o fígado e os 2 rins; nestes, o exame microscópico constatou a necrose dos epitélios, dos tubos contornados e das alças de Henle, assim como grandes quantidades de cálcio e algumas infiltrações inflamatórias em torno dos vasos; no fígado em algumas regiões, nas partes exteriores dos lóbulos agrupamentos de bacilos e de cocos e à sua volta necrose das células e desintegração dos núcleos. Além destas, não foram verificadas outras transformações. No cão D, foram examinados o fígado e os 2 rins; no corte dos rins examinados vêm-se uma hiperemia dos glomérulos e algumas modificações parenquimatosas bem como necrose dos tubos contornados e descamações no interior dos mesmos, as paredes dos tubos estão quasi que completamente fechadas e não se percebem infiltrações inflamatórias; nos cortes efetuados no fígado verificaram-se uma hiperemia e algumas modificações parenquimatosas. Nos cães F e H, foram examinados fígado e 2 rins: fígado — grande hiperemia e ofuscação parenquimatosa das células da polpa; os dois rins mostram maiores modificações no epitélio dos tubos contornados, modificações estas que consistem em transformações regressivas da ofuscação parenquimatosa por infiltração adiposa até necrose inclusive, hiperemia iminente dos glomérulos, em algumas regiões varios leucócitos nas alças de Henle, os vasos do "stroma" tambem dilatados e cheios de glóbulos de sangue, em um e outro lugares algumas infiltrações inflamatórias, e, ainda, certa quantidade de corantes extracelulares e dentro das células.

Resumindo os resultados, pode ser observado que o fígado tanto quanto os rins são afetados na nefrite causada pelo urânio e que a hiperemia é a única lesão que ocorre no fígado de um cão nefrectomizado.

DISCUSSÃO

Ao considerarmos os altos valores de NH_3 no sangue na nefrectomia, podemos perfeitamente afirmar que os rins ausentes, neste caso, não poderiam produzir amônia. O aumento de amônia não pode tão pouco ter origem exogênea, visto que os animais recusaram toda alimentação tendo apenas bebido agua. O jejum poderia possivelmente ser a causa, já que a falta de ornitina poderia impedir a fixação de NH_3 pelo fígado e sua aparição final sob a forma de uréia (KREBS) porém o "Contrôle" mostra claramente que os valores de amônia obtidos no sangue de animais em jejum são aproximadamente 8 vezes menores que os verificados no dos nefrectomizados.

PARNAS & KLISIECKI encontraram elevação da NH_3 no sangue de agonisantes, porém os dados de SCHWERIN tomados com cães são cerca de 0,091 mg % isto é, muito menores que os encontrados quando ha nefrectomia.

O aumento de NH_3 no sangue possivelmente pode ser explicado pelo fato da nefrectomia afetar profundamente a circulação causando a hiperemia de diferentes orgãos, verificada no fígado segundo resultado do exame histopatológico. Esta extáse do sangue conjuntamente com a do fígado realmente afetado funcionalmente, e com mudanças patológicas na respiração aumentaram a NH_3 do sangue. Em outras palavras o ácido adenílico, a adenosina, o adenil trifosfato e o ácido nucleico do timo, tendo encontrado no corpo vivo condições correspondentes (embora não semelhantes) às do sangue estravasado, libertam a amônia, que aumenta proporcionalmente ao rigor das condições gerais e o mesmo com relação à maior extáse.

A elevação brusca dos valores de NH_3 24 horas antes da morte do animal pode ser atribuida às convulsões, que o animal teve ao se aproximar esse momento, e como sabemos segundo EMBDEN, PARNAS, MOZOLOWSKI e LEWINSKI as contrações dos músculos produzem amônia. Tambem poderiam as convulsões ser principalmente atribuidas ao aumento de NH_3 na nefrite provocada pelo urânio. MARKET chega mesmo a pensar que a amonemia observada na nefrite humana possa ser causada pelos espasmos urêmicos.

Em vista das experiências acima relatadas os rins não podem ser considerados como principais produtores da amônia do sangue. A falta do seu poder de concentração ou de excreção pode ser atribuida parcialmente à forte elevação da NH_3 na nefrectomia e nefrite, mas seria impossivel considerá-los como fonte da amônia do sangue, já que em sua ausência a última atinge valores cerca de 0,5 mg. %. KREBS provou que o tecido renal pode formar amônia dos ácidos aminados, mas pa-

rece que esta amônia juntamente com a existente na corrente sanguínea atúe apenas no *sentido puramente químico,* como composto alcalino neutralizando a urina, quando a torna mais ácida, protegendo deste modo as vias urinárias.

Por outro lado, em virtude das mesmas já citadas e referidas experiências, e considerando que a ministração de amônia acidifica o organismo (VENULET) aumentando a amônia no sangue (KOPROWSKI & UNINSKI) podemos afirmar que esta amônia atuando no *sentido biológico,* não é de origem renal e sim produzida por um outro mecanismo até agora apenas parcialmente conhecido.

Testemunhamos a nossa gratidão ao Prof. E. J. CONWAY pela sua gentileza em demonstrar a um dos autores o seu método; ao Prof. F. VENULET e ao Dr. F. GOEBEL pela sua constante assistência e interesse nestas pesquisas; aos auxiliares do Instituto de Anatomia Patológica da Universidade de Varsóvia pelos seus exames histopatológicos e ao Dr. GILBERTO G. VILLELA do Instituto Oswaldo Cruz pela atenção que nos tem dispensado e auxílio na presente tradução.

RESUMO

1 — A taxa de NH_3 do sangue de cães em repouso é ou zero ou abaixo do nivel analisavel, segundo determinação pelo método de CONWAY. Surge tambem a mesma elevação característica (Amônia "Alfa") imediatamente após a sangria e ao cabo de 5 minutos, como nas determinações em sangue humano.

2 — A nefrectomia bilateral produz uma acentuada elevação da NH_3 do sangue, sendo o mais alto valor médio aproximadamente de 0,45 mg./100 cc. observado imediatamente antes da morte do animal.

3 — A nefrite urânica tambem causa uma elevação do NH_3 do sangue. No 10.º dia (dia da morte do animal), o valor atingiu ao máximo, sendo aproximadamente de 0,3 mg./100 cc.

4 — Em virtude dos resultados expostos é impossivel considerar os rins como a principal fonte de produção da amônia.

SUMMARY

The influence of nephrectomy and uranium nephritis on ammonia content of canine blood has been studied, ammonia being determined by CONWAY's method. The normal blood NH_3 content for resting dogs has been found to be either zero or below analytical level (Fig. 1), confirming our previous observation (1939). Nephrectomy caused a marked increase in the blood NH_3, the curve rising slowly at the period following the operation, and then taking a step rise about 24 hours before the death of the animal (Fig. 2). The highest mean value of approximately 0,45 mg./100 ml. was observed a short time before the death of the animal, the peak probably occuring in agony. Nephritis was caused by hypodermic injection of a sterile solution of uranium nitrate 7 mg./Kg. of weight). The symptomes of poisoning occurred on the seventh day after injection, when the first determinations of blood NH_3 were made. The animals died on the 10th day, when the second determination was performed. Blood ammonia values in uranium nephritis were increased, although less than after nephrectomy. The highest mean value of about 0,3 mg./100 ml. was observed in the agonized state. The controls demonstrated that anaesthetic (chloralose) has no influence on the level of ammonia in blood, and that in starvation

ammonia values are only slightly increased (0,054 mg./100 ml. as determined immediately after shedding).

Considering the results of the above experiments it was impossible to regard kidney as the chief blood ammonia producing organ. Pathological changes in circulation of blood and strong muscle contractions (convulsion) caused probably the marked NH_3 increase after nephrectomy and in uranium nephritis. It is supposed that kidneys are able only to concentrate or excrete ammonia, and that their producing power is either very limited or negligible. Blood ammonia is probably not of renal origin, the process of its formation not been up to the present time fully discovered.

BIBLIOGRAFIA

ARTOM, C., 1926, Contribution à l'étude de la fonction du rein dans la genèse de l'urée et de l'ammoniaque. *Arch. int. Physiol.*, 26: 389-427.

BANG, I., 1916, Untersuchungen über den Reststickstoff des Blutes. *Biochem. Z.*, 72: 104-168.

EUSSEL, L. & BOWMAN, G., 1939, Blood chemical changes in nephritis. *Rhode Isl. Med. J.*, 22: 133-135.

CHOLOPOFF, A. D., 1928, Herkunft und Verteilung des Blutammoniaks nach Untersuchungen an angiostomierten Hunden. *Pflügers Arch.*, 218: 670-676.

CONWAY, E. J. 1933, An absorption apparatus for the microdetermination of certain volatile substances. II/Microdetermination of urea. *Biochem. J.*, 27: 430-434.

CONWAY, E. J., 1935, Apparatus for the microdetermination of certain volatile substances. IV. The blood ammonia with observances of normal human blood. *Biochem. J.*, 29: 2755-2772.

CONWAY, E. J. & BYRNE, D., 1933, An absorption apparatus for the microdetermination of certain volatile substances. I. Microdetermination of ammonia. *Biochem. J.*, 27: 419-429.

CONWAY, E. J. & COOKE, R., 1939, Blood ammonia. *Biochem. J.*, 33: 457-478.

EMBDEN, J., 1927, Neue Untersuchungen über die Tätigkeitsubstanzen der Quergestreiftenmuskulatur und Chemismus der Muskelkontraktion. *Klin. Wschr.*, 14: 628-631.

EVTOUKOVA y JANOVISKY, K., 1935, Amonyak we krewi. *Med. Z/. Vsenkrain. Akad.*, 4: 1286.

FEYEL, P., 1939, La nephrite experimentale aiguë au nitrate d'urane (etude cytophysiologique). *Ann. Anat. path.*, 16: 561-596.

GOTTLIEB, E., 1923, Ammoniakbildung in der Niere. *Biochem. Z.*, 194: 163-176.

KOPROWSKI, H. & UNINSKI, H., 1939, Ammonia content of canine blood after oral administration of ammonium salts and ammonia. *Biochem. J.*, 33: 747-753.

KREBS, H. A., 1932, Über den Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper. *Klin. Wschr.*, 42: 1744-1750.

KREBS, H. A. & HENSELEIT, K., 1932, Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörpen. *Hoppe-Seyler Z.*, 210: 33-67.

MARKERT, W., 1935, O amoniaku we krewi. *Bull. Acad. Polon. Sc.*, 367-373.

NASH, T. P. & BENEDICT, S. R., 1921, The ammonia content of the blood and its bearing on the mechanism of acid neutralisation in the animal organism. *J. biol. Chem.*, 43: 463-488.

NENCKI, M. & ZALESKI, J., 1901, Über die Bestimmung des Ammoniaks im tierischen Flüssigkeiten und Geweben. *Hoppe-Seyler Z.*, 33: 193.

PARNAS, J. K. & KLISIECKI, A., 1926, Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. *Biochem. Z.*, 173: 223-248.

PARNAS, J. K., MOZOLOWSKI, W. & LEWINSKY, St., 1927, Über die Ammoniakbildung in isollerten Muskeln und ihren Zusammenhang mit der Muskelarbeit. *Klin. Wschr.*, 36: 1710-1711.

PRZYLECKI, St. J., 1924, Sur l'origine de l'ammoniaque excrétée par les reins. *Arch. Int. Physiol.*, 24: 13-26.

SCHWERIN, J., 1926, *Experimentelle Studien über das Blutammoniak des Menschen.* Frankfurt.

STANOJEVIC, L., 1938, *Die physiologische und klinische Bedeutung des Blutammoniaks.* Verlag Theodor Steikopt. Dresden und Leipzig.

VENULET, Fr., 1934, O zakwaszajacym dzialaniu amoniaku. *Warsz. Czas. Lek.*, 11: 1-4.

VENULET, Fr., GOEBEL, Fr. & TISLOWITZ, R., 1936, Wplyw amoniaku na rownowage kwasowo-zasadowa ustroju. *Warsz. Czas. Lek.*, 13: 1-7.

VILLELA. G. G., 1941, *Bioquimica do Sangue.* Livraria Odeon Editora, Rio de Janeiro. (cf. pp. 472-474).

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 263-265
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

"EACLES FAIRCHILDI" NOVA ESPÉCIE (Lepidoptera, Adelocephalidae) [1]

EDUARDO MAY e JOSÉ OITICICA FILHO

Museu Nacional, Rio de Janeiro, D. F.

Colégio Universitário, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 3 figuras no texto)

Descrevemos no presente trabalho uma nova espécie do gênero *Eacles* Huebner, 1819.

Nome dado em homenagem ao Sr. G. B. FAIRCHILD que capturou a espécie.
Proveniência — Capturada em Anapolis, E. de Goias, Brasil.
Holotipo na coleção MAY e um paratipo na coleção JULIUS ARP, no Museu Nacional do Rio de Janeiro.

DESCRIÇÃO DO HOLOTIPO (Fig. 1)

Côres usadas, numeradas como no "Code Universel des Couleurs" de E. SEGUY, 1936. As côres são as seguintes:

111 ("châtain"), castanho escuro; 116 ("bistre foncé"), castanho escuro; 191 ("feuille morte"), castanho claro; 226 ("jeune de cadmium"), amarello cádmio; 246 ("terre ocreuse"), amarelo palha; 575 ("gris tourterelle"), cinzento violáceo; 682 ("noir raisin"), violáceo escuro, como uva preta; 701 ("terre d'ombre"), castanho; 709 ("brum violacé"), castanho violáceo.

Antenas com a côr 246. Flagelo do lado direito com 18 segmentos quadripectinados e 22 segmentos simples.

Palpos labiais com a côr 682.

Torax com a côr geral amarela 226, tégulas incluidas, exceto uma mancha com a côr 682 e com a forma de acento circumflexo, situada no mesotorax, como mostra a figura 1.

Asas, faces superiores, (esquema, fig. 2). *Regiões*: a_1, a_2, côr 191 com um *tom róseo;* a_3 côr 191 de permeio com a côr 701; a_4 côr 701; b_1, b_2, b_3, b_4, b_5, com a côr amarela 226; c cinzento violáceo 575. *Estrias*: *1* incompleta com a côr 575, ladeada pela côr 701, formando uma mancha perto da base da asa. Estria *2* com a côr 575, ladeada por duas riscas com a côr 701. Estria *3* lunulada em toda a extensão, as lúnulas com duas côres, do lado interno da asa com a côr 682 e do lado externo 575; esta formação bem nitida desde o bordo anal até a mediana M_3, entre M_3 e M_1 a côr 575 espraiando-se e confun-

[1] Recebido para publicação a 5 de Julho de 1941.

dindo-se com a mesma côr da região *c*; entre M_1 e o ápice aparece outra vez condensada a côr 575 porém com forma de mancha. Estria *4* com a côr 709, esta côr com ligeiro tom róseo para o bordo costal. Estria *5* com uma formação análoga à da estria *3*; lunulada em toda a extensão, as lunulas desde o bordo anal até a mediana M_3 com duas côres, uma risca fina 682 e uma larga externa com a côr 575; de M_3 até o bordo costal desaparece a côr 575 e as lúnulas apresentam uma única côr 709. Do lado externo da estria em toda a extensão uma sombra estreita de côr 191 alargando-se para o bordo costal. Manchas *6* e *7* em forma de estria no bordo externo das duas asas, esta formação bem nítida na asa posterior; manchas *6* com a côr 701 e manchas *7* (franjas?) com a côr 191. As manchas *6* no bordo anal das posteriores com

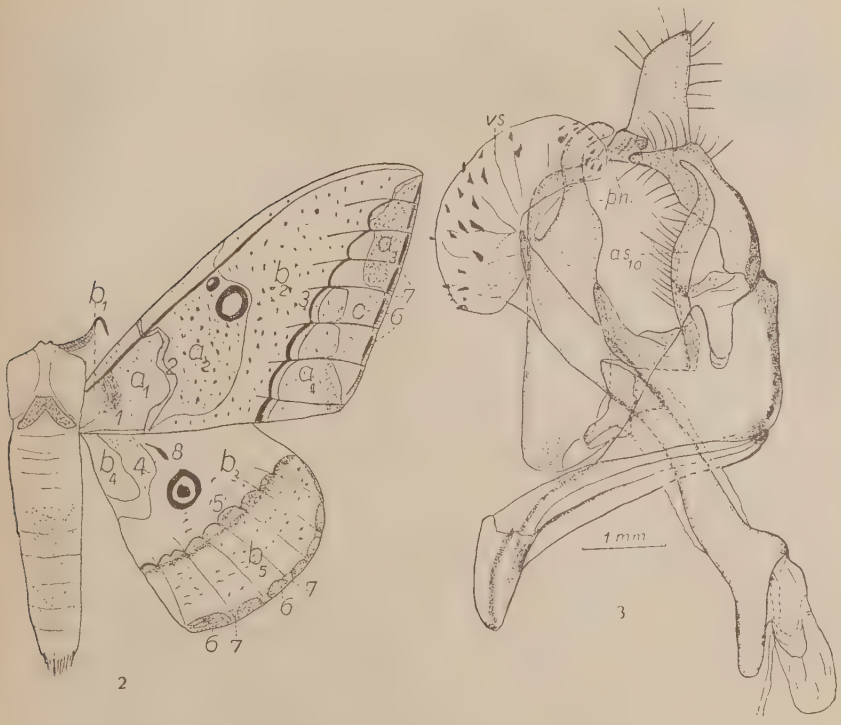
Fig. 1 — *Eacles fairchildi* n.sp.: Holotipo, face dorsal; escala 1/1. J. Oiticica Filho *phot.*

o interior cinzento violeta 575. *Manchas ocelares* em número de duas, uma grande e uma pequena nas asas anteriores, com uma coroa circular externa côr 682 e centro branco, este centro muito grande na mancha ocelar maior; mancha ocelar grande, única, nas posteriores; esta mancha típica, com duas coroas, uma externa côr 682, outra interna côr 575 e centro côr 682. Este centro escuro é talvez único entre as espécies de *Eacles* conhecidas. *Mancha 8* em forma de ponto de exclamação perto da base da estria *4*, pelo lado externo, com a mesma côr 682 da coroa externa da mancha ocelar nesta asa posterior. *Salpicos* com a côr 111-116 nas regiões a_1, a_2, b_2, a_4, b_3 (poucos, perto da estria *5*) e na região b_4.

Asas, faces inferiores. Estrias *1, 2, 4* desaparecem. Nas asas anteriores região única, côr 226, formada das regiões $b_1 - a_1 - a_2 - b_2$ da face superior. *Região* a_4 amarelo 226 abaixo da cubital posterior Cu_{1b} e com a mesma côr 191 entre Cu_{1b} e M_3. Regiões a_3 e *c* como na face superior. Nas posteriores única região formada de $b_3 - b_4 - b_5$. *Estria 3* como na face superior, porém pouco nítida e muito estreita no bordo anal. Estria *5* apenas com a côr 682 sem o cinzento 575 e estreita, uma sombra cinzenta 575 na primeira lúnula para o bordo costal. *Manchas ocelares* das anteriores como na face superior; nas posteriores com as coroas muito estreitas e o centro escuro reduzido a um ponto. *Manchas 6 e 7* como na face superior. *Mancha 8* desaparece. *Salpicos* nas regiões a_2, a_4, b_3 (muitos no bordo costal) e na região b_4.

Abdômen com a côr geral amarela 226. Pela face dorsal manchas em forma de triângulos com a côr 191. Face ventral amarela 226 exceto o oitavo *sternum* que possue a côr 682. Estigmas respiratórios violáceos.

Genitália (fig. 3) como as genitálias dos machos do grupo de *E. penelope ducalis* Walker, 1855. Difere das outras espécies do grupo pelo grande desen-



Eacles fairchildi n.sp.: Fig. 2 — esquema das asas, do torax e do abdomen; fig. 3 — genitália, vista lateral. J. Oiticica Filho *del.*

volvimento da ponta da sua harpa (*ph.*). Este formato da harpa parece-nos característico na espécie em questão. *Vesica* (*vs.*) com alguns espinhos, fracos, relativamente aos das espécies do grupo de *E. magnifica* Walker, 1855; esta vesica com a forma bem característica que aparece na figura. Possue forma tambem especifica o apêndice (as_{10}) do décimo *sternum*.

DISCUSSÃO

Espécie bem diferente das por nós conhecidas no gênero *Eacles*. Manchas ocelares nas asas típicas na espécie, assim como o conjunto de desenhos nestas asas. Genitália, lembrando de longe, a de *Eacles majestalis* Draudt, 1930, porém com a ponta da harpa e o apêndice as_{10} bem diferentes.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 267-270
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

SOBRE UM NOVO PARASITO DE ARIRANHA: — "CLOEOASCARIS LONGISPICULUM" N. SP. (Nematoda, Ascaroidea) [1]

J. F. TEIXEIRA DE FREITAS e HERMAN LENT
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 13 figuras no texto)

O gênero *Cloeoascaris* foi descrito em 1923 por Baylis, na subfamília *Anisakinae,* para uma única espécie encontrada no Território de Tanganyika, em uma lontra, *Lutra sp.,* provavelmente *L. maculicollis* (*Mustelidae*) e no estômago de *Atilax paludinosus* (*Mungotidae*), baseando-se em exemplares de ambos os sexos colecionados naquele hospedador e em 3 fêmeas do estômago deste último.

Muito semelhante a *Contracoecum,* possuindo ventrículo, divertículos esofagiano e intestinal, caracterizava-se por não possuir interlábios, e foi colocado por Yorke & Maplestone, em 1926, entre os *Anisakinae,* na família *Heterocheilidae,* enquanto Baylis & Daubney, no mesmo ano, situaram-no, tambem, na subfamília *Anisakinae,* ao lado do gênero *Galeiceps* Railliet, 1916, que engloba uma espécie insuficientemente conhecida, *Ancyracanthus cucullus* v. Linstow, 1899, para a qual Railliet creou o gênero que incluiu na família *Thelaziidae.* Nesta ocasião Baylis & Daubney manifestaram a opinião de que um possivel novo exame da espécie de Linstow pudesse demonstrar a sinonímia de *Cloeoascaris* com *Galeiceps.*

Em 1937, Schuurmans-Stekhoven, Jr., refere a presença da espécie no estômago de um macaco, *Cercopithecus leucampyx kandti* Matschie, no Congo Belga, redescrevendo a estrutura cefálica e dando desenhos detalhados. Este autor teve em mãos 22 fêmeas e 16 machos e não publicou descrição detalhada desse material que, além de parasito de hospedador muito diverso, tem algumas diferenças do de Baylis, como: dentes do lábio dorsal não bífidos; 36 papilas pre-anais; e uma papila post-anal de ápice duplo após a qual existem 3 pares de papilas simples.

Colecionada pela Comissão do Instituto Oswaldo Cruz, que em Janeiro de 1941 realizou a quinta excursão científica à Salobra, no Esta-

---

[1] Recebido para publicação a 8 de Julho de 1941.
Trabalho do Laboratório de Helmintologia do Instituto Oswaldo Cruz.

do de Mato Grosso (Brasil), pudemos estudar uma nova espécie de *Cloeoascaris*, que denominamos *C. longispiculum* n. sp., caracterizada principalmente pelo comprimento relativamente grande dos espículos, logo se distinguindo de *C. spinicollis* Baylis, 1923, tipo do gênero e unica espécie até agora descrita.

Cloeoascaris longispiculum n. sp.
(Figs. 1-13)

Comprimento — Machos 30,82 a 36,51 mm.; fêmeas 38,02 a 41,54 mm.
Largura — Machos 0,80 a 0,87 mm.; fêmeas 1,24 a 1,27 mm.

Corpo com cutícula estriada transversal e longitudinalmente. Extremidade anterior levemente atenuada em ambos os sexos, apresentando uma dilatação cuticular em forma de colar, que mede de diâmetro 0,43 mm. nos machos e 0,58 a 0,61 mm. nas fêmeas. O aspecto desta dilatação é variavel em ambos os sexos. A região do corpo situada entre esta dilatação e a base dos lábios é recoberta de espinhos filiformes que lembram cílios e se dispõem muito aproximados entre si. Bôca circumdada por 3 lábios bem desenvolvidos, que formam uma saliência conspícua adiante da dilatação cuticular cefálica; esses lábios, dos quais um é dorsal e dois látero-ventrais, são providos de 2 pares de dentes internos cônicos, de ponta simples, não bífida, e de uma papila externa mais ou menos desenvolvida. O lábio dorsal mede 0,070 mm. de comprimento nos machos e 0,087 a 0,095 mm. nas fêmeas; os lábios ventrolaterais medem 0,087 mm. nos machos e 0,104 mm. nas fêmeas. Interlábios ausentes. Esôfago medindo, da base dos lábios até o ventrículo, exclusive, 4,52 a 5,59 mm. de comprimento nos machos e 5,36 a 5,86 mm. nas fêmeas, por 0,30 a 0,33 mm. de maior largura nos machos e 0,40 a 0,41 mm. nas fêmeas. Ventrículo com 0,25 a 0,30 mm. de comprimento nos machos e 0,41 mm. nas fêmeas, por 0,26 a 0,31 mm. de largura naqueles e 0,36 a 0,40 mm. nestas. Apêndice esofagiano presente, originando-se do ventrículo e medindo 0,73 a 0,95 mm. de comprimento nos machos e 0,83 mm. nas fêmeas, por 0,15 a 0,22 mm. de largura naqueles e 0,25 mm. nestas. Intestino largo, fortemente pregueado transversalmente. Ceco intestinal presente, dirigido para diante, com 2,99 a 3,52 mm. de comprimento nos machos e 3,68 a 4,19 mm. nas fêmeas, por 0,18 a 0,20 mm. de maior largura naqueles e 0,31 nestas. Anel nervoso situado a 0,58 a 0,67 mm. da extremidade anterior nos machos e a 0,66 a 0,71 mm. nas fêmeas. Póro excretor não evidenciado. Papilas cervicais situadas a 0,66 a 0,73 mm. da extremidade cefálica nos machos e a 0,73 mm. nas fêmeas.

Fêmeas didelfas, opistodelfas, com vulva situada na metade anterior do corpo, numa região saliente, provida de um pequeno apêndice cuticular e distando 16,41 a 18,27 mm. da extremidade anterior. Vagina longa, dirigida inicialmente para trás e depois curvando-se para diante até se ligar a um ramo uterino, impar, muito longo, que se dirige para trás, dividindo-se, na região posterior do corpo em 2 ramos, relativamente curtos, que se ligam aos ovidutos, que vão ter aos ovários. Estes, se dirigem da região posterior para diante, ultrapassam um pouco a região vulvar e depois se dobram para trás, terminando na região post-vulvar. Todo o aparelho genital forma numerosas alças. Ovos de casca relativamente fina e granulosa, medindo 0,061 mm. de comprimento por 0,043 mm. de largura. O intestino termina por um reto que mede 0,22 a 0,25 mm. de comprimento. Orifício anal situado a 0,31 a 0,33 mm. da ponta da cauda. Extremidade posterior levemente atenuada, com um par de papilas situadas a 0,084 mm. de seu ápice.

Machos com espículos longos e filiformes, com base alargada e ponta fina, geralmente encurvada, com 2,5 a 3 mm. de comprimento, envoltos por uma

bainha que distalmente apresenta uma região apical fracamente quitinizada. Gubernáculo ausente. Aparelho genital dirigido para diante, não atingindo o fim do esôfago. Testículo pregueado transversalmente. Orifício cloacal grande, de rebordo forte, situado a 0,13 a 0,17 mm. da ponta da cauda. Extremidade posterior curvada ventralmente, com numerosas papilas. Papilas post-anais em número de 9 a 10 pares. Papilas pre-anais em grande número, sendo que em

Cloecascaris longispiculum n. sp. — Fig. 1: Extremidade anterior do macho; fig. 2: extremidade cefalica do macho; fig. 3: extremidade cefalica da larva; fig. 4: inicio do aparelho digestivo do macho; fig. 5: região vulvar; fig. 6: cauda da fêmea, de perfil; fig. 7: extremidade caudal da fêmea, de face; fig. 8: extremidade proximal de um espiculo isolado do corpo; fig. 9: extremidade distal do mesmo espiculo da figura anterior, não tendo sido representada a bainha; fig. 10: extremidade proximal do outro espiculo, tambem isolado do corpo; fig. 11: extremidade distal do mesmo espiculo da figura anterior, com a bainha representada; fig. 12: cauda do macho, de face; fig. 13: cauda do macho, de perfil.

um exemplar foram contadas, em um dos lados do corpo, com facilidade, 70 papilas.

Habitat — Estômago de *Pteronura brasiliensis* Zim.

Proveniência — Salobra, Estado de Mato Grosso, Brasil.

Tipos e paratipos na coleção helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz.

Examinamos desta espécie duas fêmeas e oito machos; dêstes, 2 foram dissecados. Examinamos, ainda, uma larva obtida no intestino delgado do mesmo hospedador, cuja descrição se segue:

Comprimento — 31,82 mm.

Largura — 0,70 mm.

Cutícula com estriação transversal muito delicada e linhas longitudinais nítidas. Dilatação cuticular cefálica pouco desenvolvida, no início de sua formação, com 0,35 mm. de largura. Espinhos ciliares mais nítidos que nos adultos, devido ao menor desenvolvimento do colar cuticular. Lábio dorsal com 0,035 mm. de comprimento; lábios ventrolaterais com 0,043 mm. de comprimento. Papilas labiais já formadas; dentes labiais ainda não constituidos. Esôfago com 2,44 mm. de comprimento por 0,18 mm. de maior largura. Ventrículo com 0,17 mm. de comprimento por 0,18 mm. de largura. Apêndice esofagiano com 0,35 mm. por 0,10 mm. Ceco intestinal com 0,93 mm. por 0,20 mm. Intestino pregueado transversalmente, como nos adultos. Anel nervoso situado a 0,55 mm. da extremidade anterior. Papilas cervicais a 0,75 mm. desta mesma extremidade. Extremidade posterior levemente atenuada, terminando por uma curta ponta triangular.

BIBLIOGRAFIA

BAYLIS, H., 1923, A new Ascarid from an Otter. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, ser. 9, 11: 459-463, figs. 1-3.

BAYLIS, H. & DAUBNEY, R., 1926, *A Synopsis of the families and genera of Nematoda.* XXXVI + 277 pp., London.

LINSTOW, O., 1899, Nematoden aus der Berliner Zoologischen Sammlung. *Mitt. a. d. Zool. Mus., Berlin,* 1 (2): 5-28, taf. 1-6, figs. 1-78.

RAILLIET, A., 1916, La famille des *Thelaziidae*. *J. Parasit.*, 2 (3): 99-105.

SCHUURMANS-STEKHOVEN, Jr., J. H., 1937, Parasitic Nematoda. Exploration du Parc National Albert. Mission G. F. de Witte (1933-1935), fasc. 4, 40 pp., 116 figs., Bruxelles.

STILES, C. W. & BAKER, C. E., 1935, Key-Catalogue of parasites reported for Carnivora (cats, dogs, bears, etc.) with their possible Public Health importance. *Nat. Inst. Health Bull. N.º 163,* pp. 913-1223, Washington.

STILES, C. W. & STANLEY, S. F., 1932, Key-Catalogue of parasites reported for Insectivora (moles, shrews, etc.) with their possible Public Health importance. *Nat. Inst. Health Bull. N.º 159,* pp. 791-911, Washington.

YORKE, W. & MAPLESTONE, P. A., 1926, *The Nematode Parasites of Vertebrates*. XI — 536 pp., figs. 1-307. Washington.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 271-277
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

NOVO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DO FERRO SÉRICO [1]

RUBENS SALOMÉ PEREIRA
Departamento de Industria Animal, S. Paulo

A dúvida a respeito da presença de ferro não hemoglobínico no sôro sanguíneo foi dissipada em 1925 por FONTÈS & THIVOLLE (1), e hoje admite-se, geralmente, a existência, no sangue, das tres formas seguintes: hemoglobínica, sérica e facilmente liberavel — *"Leicht abspaltbares Bluteisen"*, de BARKAN — além, naturalmente, da que faz parte do mecanismo do fermento respiratório.

O ferro sérico representa o absorvido pelo intestino, e que se transporta pelo sôro, e o resultado da decomposição da hemoglobina e de outros compostos hemínicos, que se dirige para o sistema hematopoiético, ou para os tecidos. De acôrdo com os nossos conhecimentos atuais, é provavel que êle meça o metabolismo dêsse elemento. De simples curiosidade fisiológica o estudo do ferro sérico passa a constituir assunto de alta significação biológica.

Devido às baixíssimas concentrações encontradas, à necessidade, por vezes iniludivel, de restringir-se o volume de sôro submetido à análise, e ao perigo permanente de hemólise, a dosagem do ferro sérico é problema de particular delicadeza. A eliminação completa da hemoglobina é condição indispensavel ao bom êxito do trabalho, e deve ser realizada, seja pelo preparo de sôro perfeitamente isento dela, seja pela precipitação e consequente separação de todo o hemocromogenio porventura existente no material.

A obtenção de sôro livre de hemoglobina é tarefa quasi irrealizavel, pois, como o observaram LEDERER & MAESSCHALCK (2), basta exercer pressão um pouco forte ao aspirar, ou ao expelir o sangue para que a hemólise se dê. MOORE e colaboradores (3) modificaram levemente a técnica de FOWWEATHER (4) e verificaram que, a-pesar-de todas as precauções tomadas, a hemólise se produz, particularmente quando a centrifugação não se segue imediatamente à colheita do material. À

[1] Recebido para publicação a 9 de Julho de 1941.

visto disso êles preferiram seguir o caminho indicado por Bing & Hanzal (5), mas a delicadeza da técnica empregada e as causas de erro dela decorrentes são discutidas pelos referidos investigadores, que lhe reconhecem as imperfeições.

O emprego do ácido tricloracético para fins de desproteinização foi, no caso, criticado por Fowweather (4) e por Tompsett (6), mas Heilmeyer, citado em Lederer & Maesschalck (2), demonstrou que o ácido clorídrico liberta todo o ferro sérico e que o ferro facilmente liberavel representa a totalidade dêsse elemento no sôro.

Os métodos químicos destinados à determinação de quantidades mínimas de ferro, são numerosos, mas nem todos se prestam bem, por motivos varios, à dosagem dêsse corpo no sôro. Os processos que maior aceitação têm tido são o do *tiocianato*, o do *ácido tioglicólico*, o da *α-α-di-piridina* e o da *o-fenantrolina*.

A extrema sensibilidade do método de Salomé Pereira (7); o fato de, nas condições descritas, tanto o Fe^{+++} *como o* Fe^{++} se comportarem de modo idêntico, de forma a tornar desnecessário o trabalho prévio de redução, ou de oxidação; a grande simplicidade da técnica indicada, levaram-nos a aplicá-lo à determinação do ferro sérico.

MÉTODO

A dosagem do ferro sérico compreende as tres fases seguintes:

1) ionização do ferro;

2) desproteinização do sôro;

3) determinação do metal presente no líquido incolor e límpido resultante do tratamento anterior.

1) *Ionização do ferro* — Barkan (8, 9 e 10) mostrou que a incubação do sôro em presença do ácido clorídrico diluido, à temperatura de 37° C., durante certo tempo, permite que se determine o ferro no líquido incolor e límpido obtido pela desproteinização pelo ácido tricloracético, ou pela ultrafiltração, sem que se verifiquem as perdas mencionadas por Fowweather, Tompsett, e outros.

Várias têm sido as concentrações de *Cl H* indicadas. No presente trabalho empregamos *Cl H* 0.2 N, pois mesmo no caso do sangue total, variações entre 0.1 N e 0.3 N não alteram os resultados, e assim procedemos:

Em tubos de centrifugação de 10 cc. de capacidade util, graduados à altura de 1 cc., 2 cc., 3 cc., 4 cc., 5 cc. e 6 cc., põem-se volumes de sôro compreendidos entre 0.5 cc. e 3 cc., exatamente medidos; ajunta-se, então, *Cl H* 0.2 N em quantidade igual à metade da de sôro empregada na análise; arrolham-se os tubos e colocam-se na estufa regulada a 37° C. durante, no mínimo, duas horas. Se o período de incubação puder ser mais longo, espaço de tempo conveniente é o que se compreende entre 16 e 24 horas. Barkan recomenda uma hora no mínimo; em geral, porém, êle deixa na estufa durante a noite, a incubar.

Os tubos resfriam-se, em seguida, à temperatura ambiente.

2) *Desproteinização do sôro* — Ao sôro ácido, resfriado, ajunta-se volume de ácido tricloracético a 20 % igual ao de ácido clorídrico usado na ionização do ferro. O desproteinizante deve ser posto às gôtas, cuidadosamente, e a mistura se faz cautelosa e completamente. A altura alcançada pelo líquido que se encontra no tubo, deve corresponder a uma das graduações especificadas. Deixa-se a mistura repousar durante uma hora. Centrifuga-se, então, energicamente durante 15 minutos, à velocidade de 2.500 rotações por minuto: o coágulo se separa inteiramente, e o líquido obtido, em que se encontra todo o ferro sérico, é perfeitamente incolor e límpido.

3) *Determinação do ferro presente no líquido resultante do tratamento anterior* — A dosagem do ferro fazemo-la pelo método de Salomé Pereira e, no caso presente, empregamos para o desenvolvimento da côr, os reagentes seguintes:

1) Ácido protocatéquico. — Num volumétrico de 100 cc. põe-se 0,1 g. de ácido protocatéquico e dissolve-se à temperatura ambiente por meio do álcool etílico a 50 %. Completa-se o volume com o solvente.

2) NH_4 OH 3N

3) SO_4 H_2 3N

4) Mistura de SO_4 $(NH_4)_2$ N (4 partes) e NH_4OH N (uma parte)

Uma parte alíquota — a maior possivel — exatamente medida, do líquido desproteinizado, transfere-se para um tubo de vidro "Pyrex", ou "Jena", de 100 mm. × 13 mm., graduado à altura de 1,5 cc., 2 cc., 2,5 cc., 3 cc., 3,5 cc., 4 cc., 4,5 cc. e 5 cc. Ajunta-se 0,1 cc. do reagente 1) e por cc. do desproteinizado recolhido adiciona-se, medido por pipeta de 0.1 cc. graduada em milésimos de cc., 0,1 cc. do reativo 2). Adiciona-se, então, o reagente 4), gôta a gôta, sob constante agitação, até a côr vermelha característica desenvolver-se plenamente. Completa-se, então, com o mesmo alcalinizante, volume conveniente, marcado na parede do tubo, e que, por via de regra, deve ser o menor possivel.

Se a adição do reativo 2) determinar por si só (0,1 cc.) o aparecimento da côr característica do ferro em presença do ácido protocatéquico, o que significa estar alcalino o meio convem acidificar levemente o líquido por meio de um traço do reagente 3) e levá-lo em seguida ao *pH* útil, pela mistura 4).

Durante todo o processo, faz-se ao mesmo tempo, sob condições rigorosamente iguais, um "branco', que servirá de líquido de compensação.

Todos os reagentes, todas as soluções devem ser preparados a partir de corpos do mais alto gráu de pureza, tão isentos de contaminações — particularmente de ferro — quanto possivel.

As medidas fotométricas fazem-se no fotômetro de Pulfrich, interpondo-se o filtro S 50 e empregando-se microcubas de 50 mm. de espessura. Lê-se a transparência, D, determina-se a extinção, E, calcula-se o coeficiente de extinção, k, e pela fórmula seguinte obtem-se a concentração do ferro no sôro analisado:

$$\text{mg Fe em 100 cc. de sôro} = \frac{0.930 \times k \times V}{v}$$

em que V é o volume total da solução em que se desenvolveu a côr, e v, o do sôro tomado para a determinação.

RESULTADOS

A fim de se verificar a reprodutibilidade dos resultados fornecidos pelo método que acabámos de descrever, fizemos no mesmo sôro (de gestante) dez determinações, e os números obtidos acham-se no quadro seguinte:

Volume de sôro tomado para a análise cc.	*Volume de sôro correspondente à parte aliquota tomada* cc.	*Volume final da solução corada* cc.	*D*	*E*	*k*	*Fe per 100 cc. de sôro* mg.
1.0	0.50	1.5	80	0.097	0.019	0.053
1.0	0.65	1.5	75	0.125	0.025	0.054
1.5	1.00	2.5	76	0.119	0.024	0.057
1.5	1.00	2.5	76	0.119	0.024	0.057
2.0	1.35	3.5	78	0.108	0.022	0.053
2.0	1.35	3.5	77	0.114	0.023	0.055
2.5	1.50	4.5	80	0.097	0.019	0.053
2.5	1.50	4.5	80	0.097	0.019	0.053
3.0	2.00	5.0	78	0.108	0.022	0.051
3.0	2.00	5.0	77	0.114	0.023	0.053
Média						0.054

Para se verificar a influência de pequenas quantidades de hemoglobina no sôro, fizemos quatro determinações de ferro no mesmo pro-

duto a que se ajuntou o pigmento. Os resultados vêm-se no quadro a seguir:

Volume de sôro tomado para a análise cc.	*Volume de sôro correspondente à parte alíquota tomada* cc.	*Hemoglobina ajuntada ao sôro* mg.	*Volume da solução corada* cc.	*D* .	*E* .	*k* .	*Fe per 100 cc. de sôro* mg.
2.0	1.0	1.00	3.0	79	0.102	0.020	0.056
2.0	1.0	1.60	3.0	80	0.097	0.019	0.053
2.0	1.0	3.50	3.0	79	0.102	0.020	0.056
2.0	1.0	5.80	3.0	81	0.092	0.018	0.050

O êrro "standard" é, pois

$$\sqrt{\frac{\Sigma\,(d^2)}{n\,(n-1)}} = 0.0006$$

COMENTÁRIOS SOBRE O MÉTODO

A incubação prévia do sôro com ácido clorídrico diluido é indispensavel em todos os processos em que o ferro se vai dosar no líquido desproteinizado, como o demonstrou BARKAN; nêsse caso, o ácido tricloracético pode ser usado, e as objeções de FOWWEATHER, e de outros, perdem o valor. O tempo mínimo de incubação é, segundo BARKAN, uma hora. Esse investigador, porém, acha preferivel deixar o ácido agir durante a noite, e assim procede quasi sempre. Pessoalmente, achamos aconselhavel aumentar o espaço mínimo de tempo, de uma para duas a três horas. Em geral, porém, o período de 16 a 24 horas é o que se deve tomar.

E' de toda a conveniência esperar-se que o ácido tricloracético aja pelo espaço de uma hora, antes de submeter a solução à centrifugação enérgica indicada: o líquido assim obtido é límpido e incolor.

Traços de hemoglobina não prejudicam os resultados, pois o hemocromogêneo é precipitado pelo desproteinizante. As pseudo-hemo-

globinas libertam o ferro, sob a ação do ácido clorídrico diluido, de modo que os sôros fortemente hemolisados dão números que não correspondem aos reais.

E' de inteira conveniência ajustar-se a acidez do líquido corado à do tampão: se a quantidade de NH_4OH 3 N determinar o aparecimento da côr vermelha característica, quer por não corresponderem os reagentes exatamente às concentrações indicadas, quer por ter havido engano nas medidas feitas, a côr deve ser desfeita pela menor quantidade possivel de SO_4H_2 3 N, e restabelecida logo em seguida pelo reagente 4).

Afim de evitar-se que a oxidação do ácido protocatéquico — o que facilmente se reconhece pelo tom amarelado que o líquido toma — falseie os resultados, é preferivel fazer-se a leitura 5 a 10 minutos depois do aparecimento da côr vermelha. Tempo mais longo pode permitir-se — 20 ou 30 minutos — mas desde que o mais leve indício de amarelo surja, no "branco" ou na solução em que se dosa o ferro, a análise deve ser repetida.

As soluções coradas devem conservar-se em local fresco, longe dos ráios solares, preferivelmente no escuro. Enquanto pesquisas ulteriores não revelarem meio seguro de manter longamente a estabilidade da côr, essas precauções devem ser observadas: o ácido protocatéquico é fortemente redutor, e facilmente se oxida, particularmente em meio alcalino; desenvolve-se, então, tom amarelado que se intensifica pelo passar do tempo.

Nas condições da técnica descrita (7), a temperatura, entre 20° C. e 30° C. pelo menos, não exerce ação prejudicial. E' conveniente que a solução em que se acha o ácido protocatéquico não se submeta a temperatura superior a 30° C.

Pelo presente método, todo o ferro, quer se ache como FE^{+++}, quer se encontre sob forma de FE^{++}, se determina, e não ha necessidade alguma de trabalho prévio de redução, como nos processos em que o complexo corado só se forma com o FE^{++} (α — α' — dipiridina, o — fenantrolina, etc.), ou de oxidação, como nos em que só o FE^{+++} produz a desejada côr ("ferron", salicilaldoxima, ácido salicílico, etc.).

No caso do plasma, o sangue pode ser citratado, ou oxalatado, pois, como o demonstrou Salomé Pereira (7), em presença desses iônios a côr, ao cabo de 8 minutos, apresenta o máximo de intensidade. O iônio fosfato, do sôro, não intervem e, nas condições descritas no presente trabalho, a precaução a tomar-se, indicada pelo autor (7), de ajuntar citrato de amônio afim de impedir-se a influência prejudicial, do PO_4, não se torna necessária.

Apesar do uso do "branco" para fins de compensação, todos os reativos devem ser da mais pura qualidade, tão isentos de impurezas — particularmente de ferro — quanto possivel. Todos os cuidados se

devem tomar afim de se evitar que o ferro, elemento de grande ubiquidade, contamine o material com que se fazem as determinações.

BIBLIOGRAFIA

1. FONTES, G. & THIVOLLE, L., 1925, Les Variations du fer total d'un animal au cours de l'allaitement. *C. R. Soc. Biol., Paris,* 93: 681-683.
2. LEDERER, J. & DE MAESSCHALCK, 1938, Le dosage du fer serique. *Arch. internat. méd. exp.,* 13: 385-393.
3. MOORE, C. V., ARROWSMITH, W. M. R., QUILLIGAN, Jr., J. J. & READ, J. F. 1937, Studies in iron transportation and metabolism. I. Chemical methods and normal values for plasma iron and "easily split-off" blood iron. *J. Clin. Invest.,* 16 (4): 613-626.
4. FOWWEATHER, F. S., 1934, Determination of iron in blood plasma. *Biochem. J.,* 28: 1160-1164.
5. BING, F. C. & HANZAL, R. F., 1935, Method for estimation of serum iron. *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.,* 32: 1013-1014.
6. TOMPSETT, S. L., 1934, Thiolacetic acid as reagent for determination of inorganic iron content of certain biological materials. *Biochem. J.,* 28: 1536-1543.
7. SALOMÉ PEREIRA, R., 1941, A new photometric method for the determination of iron. *J. Biol. Chem.,* 137 (1): 417-428.
8. BARKAN, G., 1927, Eisenstudien; die Verteilung des leicht abspaltbaren Eisens zwischen Blutkörperchen und Plasma und sein Verhalten unter experimentellen Bedingungen. *Z. physiol. Chem.,* 171: 194-221.
9. BARKAN, G., 1937, Vereinfachtes Verfahren zur Bestimmung des "Leicht abspaltbaren" Bluteisens, besonders des Serum-bzw. Plasmaeisens. *Klin. Wschr.,* 16: 300-302.
10. BARKAN, G., 1935, Verfahren zur Bestimmung des leicht abspaltbaren Bluteisens. *Abder. Handb. Arb. Meth.,* 5 (8): 1207-1215.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 279-284
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

TIFO EXANTEMÁTICO DO BRASIL, EM MINAS GERAIS [1]

OCTAVIO DE MAGALHÃES e ADIR ROCHA
Instituto Biológico Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais

No trabalho de síntese sobre o "Tifo exantemático do Brasil", em S. Paulo, o dr. LEMOS MONTEIRO (Memórias do Instituto Butantan — Tomo VI, 1931) diz às páginas 43: "e) Gato — (não dá o nome científico mas supomos ser o *Felis domestica*) o único animal inoculado por nós por via peritoneal, em 25-VI-1931, *não* denunciando nenhum sintoma clínico ou reação febril. Seu sangue, inoculado na cobaia 290, decorridos 13 dias, não lhe provocou reação febril nem imunidade ao virus vivo".

Nossos primeiros estudos publicados sobre o papel dos cães na transmissão ao homem do Tifo exantemático do Brasil, datam de maio de 1935. (Brasil-Médico n. 21). De então para cá nossas pesquisas só têm robustecido aquela ideia.

O *Canis familiaris* é responsavel certamente pelos focos domiciliares macissos e pela alta percentagem de infectados com "profissão doméstica".

Os felinos, vivendo também em tamanha promiscuidade com o homem, no campo e nas cidades, teriam algum papel na difusão do mal?

O gato (*Felis domestica*), mesmo na roça, caça em torno ou dentro das casas. Nas fazendas, nos paióis êle tem muito o que comer. Raramente vai ao campo ou ao mato para obter alimento. Excepcionalmente nêle encontramos carrapatos. Êle é, contudo, ao contrário do que supunha LEMOS MONTEIRO, sensivel ao virus brasileiro. Tem moléstia pouco grave, talvez em certos casos mesmo "inaparente". Não morre, mas fica durante algum tempo, pelo menos, com febre. A quantidade de virus é pequena no sangue. Quando puncionados no coração, o sangue nem sempre infecta cobaios. Daí a possibilidade do gato poder desempenhar, em alguns casos, papel de "depositário de virus", para explicar os focos domiciliares grandes. Os gatos, infectan-

[1] Recebido para publicação a 11 de Julho de 1941 e apresentado à Sociedade de Biologia de Minas Gerais em 8 de Maio de 1941.
Trabalho do Instituto Biológico Ezequiel Dias.

do-se no lar com o virus do tifo trazido pelos cães dos campos, podem ser também depositários de virus, de 2.ª mão.

Na sessão do dia 11 de abril de 1940, na Sociedade de Biologia de Minas Gerais fizemos a leitura de nossa "Nota" sobre a possibilidade de infectação de *Felis wiedi* — gato do mato. Pareceu-nos que este felino, como o doméstico, é pouco sensivel ao virus do Tifo do Brasil.

GATO DOMÉSTICO
(*Felis domestica*)

Fizemos a inoculação do lote de 6 gatos adultos com o virus do Tifo exantemático em Minas Gerais (T.E.M.G.), via peritoneal, utilizando-nos da amostra J.F.S. insulada de um caso desta moléstia em Março do presente ano. Em todas as inoculações fizemos uso de 2,5 cc. da suspensão do cérebro de cobaio sacrificado em pleno período febril da reação ao virus local do T.E.M.G. Em todos os casos foram igualmente inoculados, para testemunho de virulência, 2 cobaios, pela via intra-peritoneal, tendo os mesmos sempre reagido com lesões típicas.

Dos 6 gatos 2 não reagiram febrilmente e 4 apresentaram reação febril de mais de um gráu durante um período variavel de dias. De 1 apenas insulamos o virus de Tifo exantemático do Brasil. Nenhum teve moléstia grave, nem mesmo perdeu o apetite ou ficou tristonho.

Dois morreram de acidentes de laboratório na punção cardíaca. O gato do qual insulamos o virus do sangue está vivo, sem qualquer sintoma grave aparente. Outro amanheceu morto após queda de temperatura. Os que não tiveram reação febril estão até hoje sem maiores novidades.

Isto confirma o que, com alguns outros virus e em outros paises tem sido já visto.

N.º 1 — Este animal morreu durante a noite, tendo sido impossivel aproveitá-lo quer para a retirada do S. N. quer para a necrópsia pois pela manhã seguinte já se encontrava em mau estado de conservação. O quadro térmico foi o seguinte: temp. inicial — 39,5; 39,5 — 40,1 — 39,3 — 39,2 — 39,2 — 39,6 — 38,7 — 39,0 — 40,5 — 40,6 — 40,5 — 40,4 — 40,5 — 38,2 — 39,6 — morte. Como vemos o animal apresentou reação febril do 9.º ao 13.º dia de moléstia, caindo então a temperatura e morrendo, como ficou dito mais acima.

N.º 2 — O outro animal reagiu no 4.º dia depois de inoculado, mantendo temperatura elevada até o 7.º dia, quando foi sangrado, tendo-se feito com o material do mesmo a inoculação por via peritoneal de 2 cobaios de ns. 1868 e 4204. O animal apareceu morto na manhã seguinte, tendo apenas sido necropsiado. À necrópsia comprovou-se pequeno aumento do baço, não sendo retirado o S.N. O termograma foi o seguinte: Temp. inicial: — 39,6; — 39,3 — 40,2 — 40,3 — 40,5 — 40,6 — 40,6 — 40,8 — 40,3 — morte.

O cobaio n.º 1868 nada revelou pela necrópsia. O cobaio n.º 4204 não reagiu. Sacrificado. Baço pequeno e pequena reação testicular.

N.º 3 — O terceiro animal reagiu do 4.º ao 12.º dia, quando foi sangrado, tendo daí por diante caído a temperatura, sendo-lhe dado alta no 19.º dia após a inoculação. Foi o seguinte o termograma: Temp. inicial — 38,3; — 38,3 — 39,5 — 39,3 — 39,6 — 39,7 — 39,5 — 40,0 — 40,3 — (Sangrado) — 38,7 — 39,1 —

39,5 — 39,9 — 39,7 — 39,0 — 39,6 — 39,4 — etc. Com o sangue retirado foram inoculados os cobaios de ns. 3889 e 3877, tendo o primeiro reagido.

Cobaio n.º 3889 — Foi o seguinte o termograma: Temp. inicial — 38,7; — 38,7 — 39,9 — 39,8 — 39,9 — 40,0 — 39,7 — 40,5 — 40,9. Sacrificado: apresentava reação vulvar intensa, enorme esplenomegalia. Seu S.N. foi reinoculado nos cobaios 4000 e 1118 que reagiram tipicamente (2.ª passagem). O virus insulado deste gato está sendo conservado no laboratório.

Cobaio n.º 3877 — até o 11.º dia não reagiu. Reinoculado com virus de passagem; não reagiu. No 14.º dia — alta. Estava imunizado.

Cobaio n.º 1670 — testemunho — Termograma: 38,9 — 39,3 — 39,5 — 39,2 — 40,2 — 40,5 — 40,8 — 41 — morte. Lesões típicas.

N.º 4 — O quarto animal apresentou reação febril durante 11 dias consecutivos, tendo a mesma se iniciado 4 dias após inoculação intraperitoneal do virus do T.E.M.G. Foram feitas 2 sangrias deste animal: 1.º) no 5.º dia de inoculação virulenta, tendo sido injetados os cobaios de ns. 3848 e 3852 com 3 cc. do sangue, via peritoneal.

O cobaio n.º 3852 teve alta após 14 dias, sem reação. Reinoculado. Reagiu — 2.º. Termograma: 38,9 — 39,4 — 39,5 — 39,4 — 39,4 — 40,3 — 40,9 — 40,3 — 40,4 — 40,5 — 39,7 — 40,0 — 39,0 — 38,7 — morte. Lesões típicas. Não estava imunizado.

Cobaio n.º 3848 — apresentou o seguinte quadro térmico: Temperatura inicial — 39,4; 39,4 — 39,2 — 40,0 — 40,0 — 40,5 — 40,4 — 37,7 — morte. Necropsiado, apresentava baço normal e nenhuma reação vulvar. A 2.ª sangria do gato, feita no 15.º dia de moléstia, forneceu material para inoculação dos cobaios 596 (morta no dia seguinte e abandonada) e n.º 3099, sem reação. O cobaio n.º 3099 foi reinoculado. Quadro térmico: 39,0 — 38,6 — 38,6 — 39,2 — 39,5 — 40,5 — 40,9 — 40,8 — morte. Lesões típicas. Não estava imunizado. O gato sucumbiu à sangria, tendo sido feita a necrópsia que revelou enorme esplenomegalia e fígado marmóreo, tendo sido retirado de ambos material para exame histopatológico. Retirado o S.N. foi o mesmo inoculado nos cobaios 1119 e 1106, que não reagiram. Foi o seguinte o termograma deste gato: Temperatura inicial — 38,7; — 38,9 — 39,5 — 39,6 — 40,7 — 40,6 — 40,8 — 40,8 — 40,6 — 40,3 — 40,3 — 40,4 — 41,3 —40,7 — 40,0 — Morte.

Cobaio n.º 1119 — Morreu no 22.º dia. Necrópsia normal.

Cobaio n.º 1106 — Reinoculado 21 dias depois. Termograma: 39,5 — 39,3 — 39,4 — 39,8 — 39,5 — 39,4 — 40,0 — 41,0 — 41,3 — 40,5 — 40,8 — morte. Lesões típicas.

Testemunho dos cobaios de ns. 3852, 3099, 1119 e 1106: Cobaio n.º 749 — Temp.: 39,2 — 39,4 — 39,0 — 39,5 — 40,3 — 39,2 — 39,4 — 40,0 — 40,5 — 40,5 — 40,5 — 40,0 — morte. Lesões típicas.

PACAS
(*Coelogenis paca*)

Procurando a sensibilidade da paca ao virus do T.E.M.G. inoculamos um lote de 3 animais, por via peritoneal, com uma suspensão de virus local da mesma origem do usado nas experiências dos gatos. Do mesmo modo foram sempre inoculados 2 cobaios testemunhas com a mesma suspensão, tendo os cobaios reagido sempre (os mesmos que serviram para os gatos).

Paca n.º 1 — Uma paca já se encontrava no 22.º dia de inoculada, não tendo, até então apresentado qualquer reação. Vinha se alimentando bem, vivendo normalmente. Temp. inicial — 39,8; — 39,8 — 39,4 — 38,0 — 37,8 — 38,3 — 37,6

— 38,9 — 38,7 — 38,9 — 38,9 — 37,1 — 37,1 — 38,7 — 39,1 — 38,3 — 38,6 — 38,7 — 37,8 — etc.

Weil-Felix — dia 28-5-1941 (26.º dia de moléstia). Aglutinação em grupo e O.X.K. — 1/320; O.X.2 — 1/80; O.X.19 — 1/40.

Sangramos este animal no 26.º dia e inoculamos os cobaios:

Cobaio n.º 3740 que não reagiu. Alta. Morreu no 20.º dia, antes da reinoculação do virus. Apresentava ligeiro aumento do baço.

Cobaio n.º 613 — quadro térmico — 39,5 — 39,0 — 39,3 — 39,4 — 40,1 — 40,5. Morte. Lesões típicas. Com o sistema nervoso central reinoculamos os cobaios de ns. 1842 e 1924 que tiveram alta no 16.º dia sem reação térmica alguma. Reinoculados 21 dias após com virus de passagem.

Cobaio n.º 1924 — Morreu no 5.º dia após reinoculação com virus de passagem, sem reação térmica apreciavel. Necrópsia: ligeira esplenomegalia.

Cobaio n.º 1842 — Sacrificado 12 dias após reinoculação, sem reação térmica. Necrópsia — ausência de lesões. Estava imunizado.

Paca n.º 2 — Weil-Felix — dia 28-5-41 (10.º dia de moléstia). O.X.K. — 1/320.

Na sombra e enjaulada. Temp.: 41,5 — 41,5 — 39,3 — 39,3 — Inoculada — 39,4 — 39,2 — 38,6 — 38,7 — 38,7 — 38,6 — 38,6 — Sangrada. (Inoculados os cobaios de ns. 1833 e 1837 que não reagiram) — 38,8 — 39,4 — 39 — 39,5 — 39,5 — 39,4 — 39 — 39 — 39,3 — Alta.

Após 21 dias os cobaios 1833 e 1837 foram reinoculados com virus de passagem.

Cobaio n.º 1833 — Termograma: 39 — 39,7 — 39,3 — 38,7 — 39,5 — 40 — 41 — 41,1 — 41,5 — 41. Morte. Lesões típicas. Não estava imunizado.

Cobaio n.º 1837 — Temps.: 39 — 39,8 — 39,4 — 38,7 — 39,5 — 39,7 — 40,4 — 40,8 — 41 — 41. Morte. Lesões típicas. Não estava imunizado.

Cobaio n.º 758 — Testemunho do virus. Temps.: 38,4 — 38,6 — 39,4 — 39,5 — 41 — 41 — 41,5 — 41,1. Morte. Lesões típicas.

Cobaio n.º 3881 — Testemunho do virus da paca n.º 2 — Temps.: 39,5 — 40,1 — 40,4 — 40,8 — 41,3 — 41,3 — 41,3. Morte. Lesões típicas.

Paca n.º 3 — Weil-Felix — 23-5-41 (15.º dia de moléstia); O.X.K. — 1/320; O.X.19 — 1/40; O.X.2 — 1/40. Termograma: 39,5 — 39,9 — 39 — 39,7 — 38,9 — 39 — 38,9 — 39 — 38,9 — 38,2 — 38,9 — 38,8. Sangramos no coração e inoculamos os cobaios de ns. 474 e 1788.

Cobaio n.º 474 — Alta. Sem reação. Reinoculado com virus de passagem 21 dias após. Apresentou o seguinte termograma: 39,6 — 39,7 — 39,5 — 39,9 — 39,2 — 39,1 — 39,5 — 40,6 — 40,1 — 40,7 — 40,5. Morte. Necropsiado. Baço volumoso. Não estava imunizado.

Cobaio n.º 1425 — Testemunha do virus com que foram inoculados os cobaios de ns. 474, 1924 e 1842: Temps.: 39,7 — 39 — 40,7 — 39,5 — 40,2 — 41,2 — 41. Sacrificado. Lesões típicas.

Cobaio n.º 1788 — Temps.: 39,6 — 40,2 — 40,1 — 39,9 — 39,8 — 39,8 — 39,5 — 39,3 — 39,6 — 40,2 — 40,3 — 40,7 — 40,9 — 40,9. Reação escrotal ligeira. Baço normal. O encéfalo deste cobaio serviu para inocular os cobaios de ns. 721 e 288. Sem reação. Alta no 14.º dia. Reinoculados com virus de passagem, reagiram. Não estavam imunizados.

Cobaio n.º 721 — Reinoculado no 22.º dia. Temps.: 39,7 — 38,8 — 38,8 — 39,6 — 40,3 — 40,7 — 40. Morte. Lesões típicas.

Cobaio n.º 288 — Temps.: 39,1 — 39,5 — 39,2 — 39 — 40,7 — 40,6 — 40,7. Morte. Lesões típicas.

Testemunho 3494 — Temps.: 39,2 — 39 — 39,1 — 39,7 — 40,5 — 40,3 — 41 — 40,2. Morte. Lesões típicas.

A paca n.º 3 morreu no dia da sangria. O S.N.C. foi inoculado nos cobaios: 1566 e 1784 que não reagiram. Reinoculados no 21.º dia com virus de passagem.

Cobaio n.º 1566 — Termograma: 39,4 — 39,5 — 39,5 — 39,5 — 40,2 — 40,8 — 41,5 — 41,2 — 40. Morte. Lesões típicas. Não estava imunizado.

Cobaio n.º 1784 — Termograma: 39 — 39 — 39,3 — 39 — 40,4 — 40,5 — 40,4 — 40,5. Morte. Lesões típicas. Não estava imunizado.

Cobaio n.º 121 — testemunha — com o seguinte termograma: 39,8 — 39,2 — 39 — 39,2 — 40,2 — 40,9 — 41,1. Morte. Lesões típicas.

Cobaios Testemunhos

1) Dos gatos ns. 1 e 5 e Paca n.º 1: Cobaio n.º 3847 — Inoculado com virus de sangue G.F.S. (10-4-41). Temps.: 39,3 — 39,8 — 40,2 — 40,7 — 41 — 41 — 41. Morte. Sacrificado. Reação testicular. Lesões típicas.

2) Dos gatos ns. 2 e 6: Cobaio n.º 3849 (24-4-41) — Temps.: 39,3 — 39,4 — 39,3 — 39,2 — 40,3 — 40,2 — 40,6 — 40,9. Morte. Lesões típicas.

3) Do gato n.º 3 e n.º 4 (18-4-1941): Cobaio n.º 3856 — 39,3 — 39,7 — 39,5 — 40,5 — 41,1 — 41,5. Morte. Lesões típicas.

CAXINGUELÊS
(*Sciurus pirrhonotus*)

Caxinguelê n.º 1 — (macho pequeno) — 16-6-41. Inoculado via intra-peritonial com virus de passagem do cobaio n.º 1425. Temps.: 37,2 — 38,2 — 38,5 — 38,7 — 37. Morte. Baço pequeno. S.N. foi reinoculado nos cobaios de ns. 268 e 1589.

Cobaio n.º 268 — Temps.: 39 — 40 — 40,2 — 39,5 — 40,6 — 40,7. Morte. Lesões típicas.

Cobaio n.º 1589 — Temps.: 39,3 — 39,9 — 40 — 39,7 — 41,2 — 41,3. Morte. Lesões típicas.

O S.N.C. desses dois cobaios foi reinoculado nos cobaios 1701 e 264. (2.ª passagem).

Cobaio n.º 1701 — Temps.: 38,7 — 39,6 — 39,7 — 39,7 — 40,5 — 41 — 40. Morte. Lesões típicas.

Caxinguelê n.º 2 — (macho adulto) — inoculado via intra-peritoneal com virus do cobaio n.º 1970. — Temps.: 39,6 — 39,2 — 39,5 — 39,7 — 39,2 — 39,4 — 40,9 — 40,6 — 41. Morte. Lesões típicas. Temperatura do caxinguelê: 38,9 — 38,3 — 37,5 — 38,8 — 39,5 — 39,5 — 36,5. Morte. (Sacrificado). Baço pequeno. Apresentou reação testicular. Com o sangue do coração inoculamos o cobaio n.º 1910 — Temps.: 39,7 — 40,3 — 41,1 — 41 — 40,9 — 40,6. Morte. Lesões típicas. Com o S.N.C. deste cobaio reinoculamos os cobaios (2.ª passagem) n.º 1786 — Temps.: 39,2 — 39,3 — 40,3 — 40,8 — 40,8 — 40,3. Morte. Lesões típicas; e n.º 4186 — Temps.: 39,4 — 39,2 — 39,4 — 40,7 — 40,8 — 40,3. Morte. Lesões típicas.

Com o sistema nervoso central do caxinguelê n.º 2 reinoculamos os cobaios de ns. 1432 e 1338.

Cobaio n.º 1432 — Temps.: 39,5 — 40,3 — 41 — 41 — 41 — 40,7. Morte. Lesões típicas. Com o S.N.C. reinoculamos o cobaio n.º 1654 — Temps.: 39 — 39 — 39,3 — 40,6 — 40,3 — 38,8. Morte. Lesões típicas.

Cobaio n.º 1338 — Temps.: 38,8 — 39,2 — 39,4 — 39,6 — 39,6 — 40,3 — 40,7 — 40,7 — 41 — 40. Morte. Lesões típicas inclusive testicular.

Caxinguelê n.º 3 — (fêmea adulta). Inoculado, via intra-peritoneal, com o S.N.C. do cobaio n.º 1970. Temperatura do caxinguelê: 38,6 — 38,8 — 39 — 39,7 — 38 — 38,7. Morte. Baço pequeno. O S.N.C. foi reinoculado nos cobaios (2.ª passagem).

Cobaio n.º 1768 — Temps.: 39 — 40 — 40,3 — 40,4 — 40,6 — 40,8. Morte. Lesões típicas. Com o S.N.C. deste cobaio reinoculamos os cobaios de ns. 1453 e 716.

Cobaio n.º 1808 — Temps.: 39,4 — 39,3 — 39,8 — 39,9 — 39,8 — 40,4 — 40,7 — 40,5 — 40,2 — 39,4. Morte. Lesões típicas inclusive reação testicular.

Cobaio n.º 1453 (2.ª passagem). Temps.: 39,4 — 39,3 — 40,1 — 40 — 40,1 — 38,7. Morte. Lesões típicas.

Cobaio n.º 716 (2.ª passagem). Temps.: 39,3 — 39,3 — 39,5 — 40 — 40 — 39,5. Morte. Lesões típicas (inclusive testicular).

Como vemos, os três caxinguelês reagiram pouco e de modo diferente. Nenhum apresentou temperatura retal com diferença de 1 grau. Dois não reagiram febrilmente e todavia *todos* tinham o "virus" no sangue circulante. O de n. 1, cuja temperatura máxima se elevou apenas 0,6, mostrou uma nítida reação testicular. Dois morreram naturalmente no 5.º ou 6.º dia. Um, estando com a temperatura baixa, foi sacrificado no 7.º para 8.º dia de doença.

RESUMO

O gato (*F. domestica*) é pouco sensivel ao virus do Tifo exantemático do Brasil. Ele pode ter, quando inoculado, uma moléstia benigna, pouco febril, ou inaparente, com ou sem virus no sangue.

A paca (*Coelogenis paca*) aparentemente não tem moléstia mas é sensivel ao virus do Tifo exantemático do Brasil. No sangue encontra-se pequena quantidade de virus.

Os caxinguelês (*S. pirrhonotus*) são sensiveis ao virus do Tifo exantemático do Brasil.

BIBLIOGRAFIA

LÉPINE, P. & LORANDO, N., 1935, Le Typhus exanthématique du chat. *Bull. Soc. Path. exot.*, 28 (5): 356-360.

LE CHUITON, F., BERGE, C. & PENNANÉAC'H, J., 1935, Transmission expérimentale au chat du typhus murin (souche Toulonnaise). Premières considérations sur cette transmission. Présence du virus dans l'urine. *Bull. Soc. Path. exot.*, 28 (8): 685-688.

LEVADITI, C. & LÉPINE, P., 1938, *Les Ultravirus des Maladies humaines* (*cf. p.* 634). Maloine édit., Paris.

CIUCA, M., BALTEANU, I. & CONSTANTINESCO, N., 1936, Réceptivité du chat au virus exanthématique. Infection spontanée. Forme inapparente. *Bull. Acad. Méd. Roumanie*, 1 (2): 271-274.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 285-291
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

SOBRE A DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DOS TOCOFEROIS (VITAMINA E) [1]

GILBERTO G. VILLELA

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 3 figuras no texto)

A avaliação quantitativa da vitamina E pelo ensaio biológico em animais exige um tempo longo e cuidados especiais que dificultam a apreciação dos resultados. Por isso ainda não foi até agora estabelecida uma unidade biológica para esta vitamina.

A introdução de métodos químicos para a determinação da vitamina E facilitou enormemente as análises dos produtos e medicamentos contendo esta vitamina. A rapidez e principalmente a possibilidade de analisar quantidades relativamente pequenas de material evidenciam as vantagens do método químico.

KARRER & KELLER publicaram em 1938 uma técnica de dosagem dos tocoferois pela titulação potenciométrica com o tricloreto de ouro. O método não distingue o α do β-tocoferol mas dá a soma de ambos. A-pesar-disso, existe concordância muito grande entre êste método e o ensaio feito em ratos. Os carotenoides tambem reagem da mesma forma com o tricloreto de ouro exigindo uma pequena correção nos resultados. Quando se desejam dosagens em série, o método de KARRER não é prático visto levar algumas horas para ser executado. Mais conveniente é o método de EMMERIE & ENGEL (1938) que se baseia na oxidação dos tocoferois pelo percloreto férrico em meio alcoólico (etanol). Os ionios ferrosos formados são convertidos num complexo vermelho pela adição de α, α'-dipiridil sendo a côr medida num fotômetro. Quantidades de 0,1 a 0,4 mg. podem ser facilmente dosadas. Como os carotenoides tambem tomam parte na reação, ha necessidade de uma correção ou separá-los por adsorção.

O método mais simples é o de FURTER & MEYER que consiste na oxidação dos tocoferois a quente pelo ácido nítrico concentrado em

[1] Recebido para publicação a 14 de Julho de 1941.
Trabalho apresentado ao 1º Congresso da Associação Química do Brasil, realizado em S. Paulo nos dias 21-26 de Julho de 1941.

meio alcoólico. O produto da oxidação é vermelho e pode ser medido num colorímetro ou num fotômetro. Os carotenoides não prejudicam a reação.

Bem que seja impossivel distinguir pela reação nítrica o α do β-tocoferol, de atividades biológicas diferentes, a sua simplicidade e a suficiente precisão o tornam de grande utilidade nas determinações em série.

Foi nosso intuito estudar o método de FURTER & MEYER no que diz respeito à dosagem de vitamina E dos produtos naturais ou farmacêuticos onde frequentemente existem substâncias que interveem na reação.

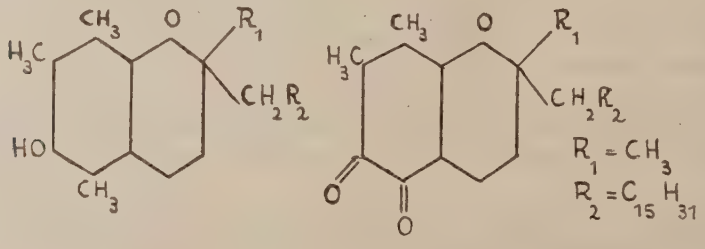
ESPECIFICIDADE

FURTER & MEYER praticaram a reação com 32 compostos diferentes e verificaram que somente os tocoferois produzem uma coloração vermelha. Os óleos ensaiados (linhaça, oliva, sésamo, fígado de bacalháu, amendoim) não dão côr vermelha. O óleo de rícino produz uma leve tonalidade rósea e o de germen de trigo uma coloração vermelha porque contem quantidades comprovadas de vitamina E.

SMITH, IRWIN & UNGNADE mostraram que além dos α, β e γ-tocoferois e da 2,2,5,7,8-penta-metil-6-hidroxicromana, alguns compostos de estrutura semelhante tambem dão a reação: m-xilo-tocoferol (sintético) 2-4-6-tri-metil-7-alil-5-hidroxicumarana, alil-p-amino-fenol, tetra-metil-o-benzo-hidroquinona e o catecol.

E' particularmente importante a reação positiva com o catecol (pirocatecol) dada a frequência com que este composto se encontra nos produtos naturais podendo portanto falsear os resultados. No caso dos óleos deve tambem ser levado em consideração a presença de produtos de oxidação de côr vermelha (o-quinonas) que perturbem a dosagem.

O produto vermelho de oxidação obtido com o ácido nítrico é um óleo não cristalizavel. O produto de oxidação parece ter a configuração abaixo (SMITH e colaboradores) que por conveniência colocamos ao lado da fórmula do tocoferol:



α — tocoferol Produto de oxidação

A extinção molecular do composto oxidado puro é de 4670 a 4500 mμ. O máximo obtido pela reação de FURTER é de 4600 mμ, fazendo supor não ser a reação completa.

Além dos compostos investigados por FURTER & MEYER e por SMITH procuramos verificar como se comportavam outras substâncias passiveis de existirem nos produtos naturais ou em preparados medicamentosos.

Substância	*Côr*	*Substância*	*Côr*
Colesterol	incolor	Ácido ascórbico	incolor
Ergosterol	incolor	Tiamina (clorhidrato) ..	incolor
Vitamina A	amarelado	Cresol	amarelo
β-Caroteno	amarelo	Ácido nicotínico	incolor
2-metil-1,4-Naftoquinona (vit. K_3)	amarelo	Nicotinamida	incolor

Para a reação de FURTER se processar torna-se necessário que o solvente seja um álcool ou um fenol. Segundo SMITH, os álcoois são indispensaveis para a oxidação porque entram na reação não só como solventes mas tambem como reagentes. O etanol foi usado por FURTER & MEYER para a obtenção do espetro de absorção. Nós verificamos que tanto o benzol como o toluol ou o xilol tambem podem servir como solventes principalmente quando a extração do material ativo é feita com benzina.

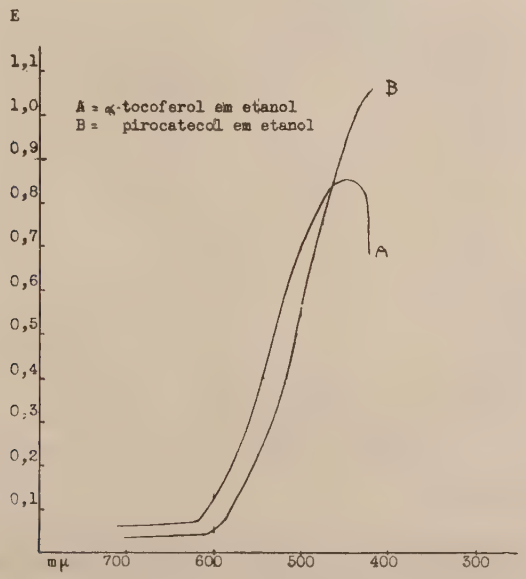


Fig. 1 — Curvas de absorção do tocoferol e do pirocatecol em etanol

O pirocatecol em meio alcoólico reage com o ácido nítrico produzindo, mesmo a frio, uma côr vermelha que passa ao amarelo mais rapidamente do que no caso dos tocoferois. A curva de absorção por nós obtida é semelhante à das o-quinonas derivadas da oxidação dos tocoferois.

Quando o pirocatecol se encontra conjuntamente com o tocoferol a reação é mais intensa e os resultados exprimem portanto valores mais elevados.

	$D\ \%$	$E = log \frac{I_o}{I_t}$
Tocoferol (1 mg.)	44	0,357
Tocoferol (1 mg.) + pirocatecol (3 mg.)..	14	0,854

O pirocatecol tambem dá uma reação corada em vermelho quando o solvente é o benzol ou xilol. Empregando-se o isobutanol a côr é amarela com o pirocatecol e vermelha com o tocoferol. No gráfico (fig. 2) acham-se as curvas de absorção das reações feitas com o tocoferol e o pirocatecol usando-se vários solventes (benzol, xilol e isobutanol).

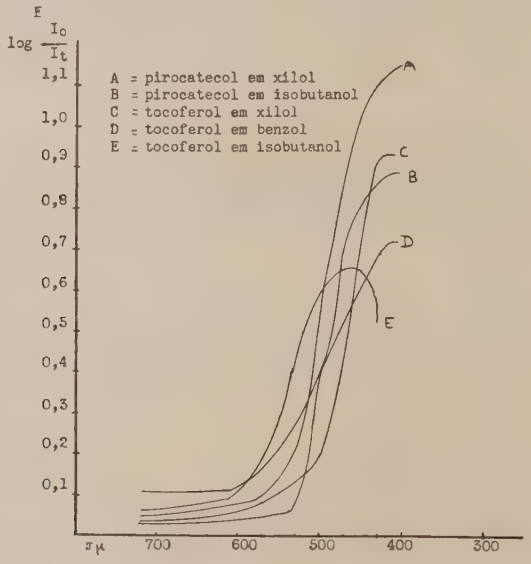


Fig. 2 — Curvas fotométricas de absorção do tocoferol e do pirocatecol em benzol, xilol e isobutanol.

Procuramos isolar o catecol do tocoferol quando ambos estão presentes num mesmo material empregando vários adsorventes, mas foi

o óxido de alumínio (padronizado segundo BROCKMAN) que nos deu os melhores resultados. O Al_2O_3 adsorve, em meio alcoólico (etanol), somente o pirocatecol deixando o tocoferol no filtrado.

	D %	*E*
Tocoferol (1 mg.) adsorção com Al_2O_3	45	0,347
Tocoferol (1 mg.) + pirocaterol (1 mg.) adsorção em Al_2O_3	47	0,328

FURTER & MEYER acharam que a dosagem podia ser praticada diretamente nos óleos contendo a vitamina E. Para isso êles recomendam fazer a leitura final no fotômetro nas duas camadas, isto é, na de etanol e na de óleo que fica insoluvel. A camada oleosa é então dissolvida em acetona e a côr fotometrada. A soma das duas leituras ($E_1 + E_2$) exprime então a quantidade total.

Para o óleo de germen de milho em natureza e depois de saponificado encontramos valores que diferem de ± 10 a ± 15 %, pela técnica de FURTER & MEYER (soma das duas leituras). Achamos preferivel fazer a reação com o óleo ou o insaponificado dissolvidos em isobutanol de modo que não ha separação de duas camadas porque o óleo insoluvel no etanol se dissolve no isobutanol. Para isso construimos o gráfico (fig. 3) com o tocoferol dissolvido em isobutanol e aquecido 5 minutos depois da adição do ácido nítrico. Como a reação no isobutanol é mais lenta, deve-se aquecer durante 5 minutos em vez de 3 minutos como é necessário quando o solvente é o etanol.

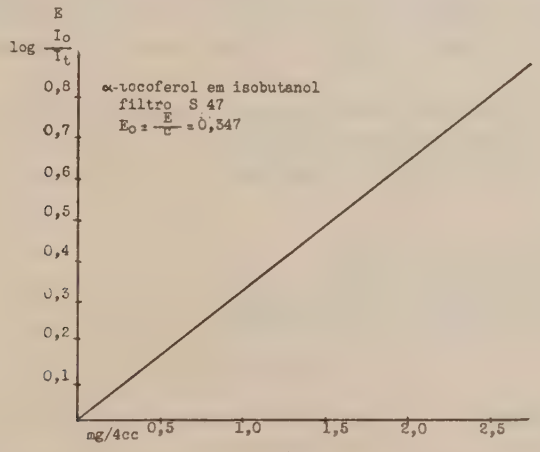


Fig. 3 — Relação entre a extinção $\log \frac{I_o}{I_t}$ e a concentração de tocoferol (reação feita em isobutanol).

As dosagens podem ser praticadas no óleo (tomando-se 0,5 gr.) e dissolvendo-o em 5cc. de isobutanol bidistilado. Aquece-se durante 5 minutos no banho-maria em balão de Erlenmeyer de 25cc. ou melhor,

em tubo largo de Pyrex, fechado com uma rolha perfurada por um tubo longo e fino servindo de condensador de refluxo. Retira-se do banho-maria e adiciona-se 1cc. de ácido nítrico concentrado. Agita-se bem e leva-se novamente ao banho-maria onde permanece durante 5 minutos exatos. Deixa-se esfriar e leva-se ao fotômetro de Pulfrich, usando-se uma cuba de 1 cm. e o filtro espectral S47. Na outra cuba de compensação coloca-se isobutanol e ácido nítrico em proporção idêntica. Feita a leitura procura-se no gráfico a quantidade de vitamina E referida como α-tocoferol. O coeficiente de extinção específico E_0 calculado deu 0,347. O mesmo coeficiente feito com a reação em etanol nos deu 0,340. A côr é bastante estavel, assim a leitura pode ser feita até 2 horas sem mostrar diferença. Em 12 horas já se nota uma baixa do coeficiente de extinção de 20 % do inicial.

Usando a técnica acima fizemos algumas determinações no óleo de germen de trigo, no óleo de germen de milho, no extrato benzínico do germen de milho e no resíduo da prensagem do germen (torta). Como o óleo de germen de milho contem substâncias que reagem com o ácido nítrico, além dos tocoferois e compostos corados (em amarelo e vermelho) é preferivel fazer-se a adsorção com o óxido de alumínio antes de se processar a reação.

Os valores por nós obtidos indicam para o óleo de germen de milho uma percentagem de 100 a 200 mg. expressos em α-tocoferol. Os produtos de oxidação existentes no óleo de germen de milho parecem ser o pirocatecol e algumas o-quinonas. Estas últimas existem em quantidade apreciavel principalmente nos óleos velhos submetidos à ação da luz. Nestes casos a dosagem não corresponde à atividade biológica de vitamina E.

A presença de carotenoides não altera a leitura fotométrica porque o máximo de absorção é afastado de 470 mμ.

O resultado de algumas análises nos forneceram os seguintes valores:

	Mg. para 100 gr.
Óleo de germen de milho	196
Extrato benzínico de germen de milho	88
Extrato benzínico do resíduo (torta)	77

ABSTRACT

Observations on the Photometric Determination of Tocopherol (Vitamin E)

The oxidation of tocopherols with nitric acid in alcoholic solution was studied to the determination of vitamin E content of vegetable oils and pharmaceutical preparations. The observation related by Ungnade & Smith that catechol gives the Furter reaction was confirmed and the absorption curve of catechol in ethanol was determined (Fig. 1). It was observed that catechol greatly influences the reaction when present with α-tocopherol in the same solution and

that aluminium hydroxide (standardized according to BROCKMANN) is useful to separate both substances. Catechol is adsorbed in ethanol or isobutanol solution whereas tocopherol did not. Catechol absortion curves in ethanol, xylol, benzol and isobutanol are presented in comparison with those obtained with tocopherol in the same solvents. When working with corn germ oil it was verified that the oil or the unsaponifiable fraction could be dissolved preferably with isobutanol. The reaction with nitric acid in this solvent is slower but the photometry could be done more accurately avoiding the procedure employed by FURTER & MEYER, i.e., photometric readings of both oil-acetone and ethanol layers. Fig. 3 shows the relation between the concentration of α-tocopherol dissolved in isobutanol and the extinction coefficient obtained with the Pulfrich photometer.

BIBLIOGRAFIA

EMMERIE, M. & ENGEL, CH., 1939, Colorimetric determination of tocopherol (Vitamin E). *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas,* 57 (12): 1351-1355; 58 (3): 283-298.

FURTER, M. & MEYER, R. E., 1939, Eine quantitative photometrische Bestimmung von Vitamin E. *Helv. Chim. Acta,* 22 (1): 240-250.

KARRER, P., ESCHER, R., FRITSCHE, H., KELLER, H., RINGIER, B. & SALOMON, H., 1938, Konstitution und Bestimmung des α-Tocopherols und einiger ähnlicher Verbindungen. *Helv. Chim. Acta,* 21 (5): 939-953.

KARRER, P. & KELLER, H., 1938, Quantitative Bestimmung der Tocopherole in verschiedenen Ausgangsmaterialen. *Helv. Chim. Acta,* 21 (5): 1161-1169.

SMITH, L. I., 1940, Organic chemistry in the porsuit of vitamin research. In "Chemistry and Medicine". Ed. M. B. Visscher, *The University of Minnesota Press.* Minneapolis.

SMITH, L. I., IRWIN, W. B. & UNGNADE, H., 1939, The Chemistry of vitamin E. XVII. The oxidation produts of α-tocopherol and of related 6-hydroxychromans. *J. Am. Chem. Soc.,* 61: 2424-2430.

UNGNADE, H. & SMITH, L. I., 1939, The Chemistry of Vitamin E. XV. An extension of the analytical method of Furter and Meyer. *J. Org. Chem.,* 4 (3): 397.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 293-300
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

INFLUENCE DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE ET DE L'OXYGÈNE EN POURCENTAGES VARIABLES SUR LES COURBES DE DURÉES DES RÉFLEXES DE LA PRÉPARATION MOELLE ISOLÉE-TRAIN POSTÉRIEUR DE LA GRENOUILLE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE [1]

MIGUEL OZORIO DE ALMEIDA, H. MOUSSATCHÉ et M. VIANNA DIAS
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Avec 3 figures)

Nous avons montré dans un mémoire récent (1), que la durée des réflexes de la préparation moelle isolée-train postérieur de la Grenouille est une fonction de la température du bain où se trouve plongée la colonne vertébrale contenant la moelle. La courbe qui représente les phénomènes monte, en partant des températures les plus basses, passe par un maximum placé aux environs de 18 à 20° C., et redescend avec une pente moins raide que celle de l'ascension, pour les températures supérieures à l'optimum. L'époque de l'année montre une influence nette sur la courbe du phénomène. La même forme est conservée, mais, dans la saison fraîche, les durées sont plus grandes pour une certaine portion de la branche ascendante de la courbe, c'est-à-dire, la partie correspondante aux températures au-dessous de l'optimum. La durée maxima est elle-même beaucoup plus longue en hiver qu'en été.

On peut supposer, *à priori*, que l'épuisement des réflexes est en liaison étroite avec les échanges respiratoires. Évidemment, dans les conditions des expériences décrites, l'anhydride carbonique produit dans les centres nerveux est accumulé, et l'oxygène préexistant est consommé. La tension de CO_2 monte et la tension de l'oxygène se réduit. Il était donc nécessaire, avant d'aller plus loin et surtout, avant tout essai d'interprétation, de faire des expériences en partant d'une tension déjà augmentée de CO_2 ou d'une tension déjà réduite d'oxygène.

Les expériences sur l'action de l'anhydride carbonique et de l'oxygène furent réalisés dès le début de nos recherches sur la question de

[1] Reçu le 15 Juillet 1941.
Travail du Laboratoire de Physiologie de l'Institut Oswaldo Cruz. Fondation Sicard.

la durée des réflexes en fonction de la température. Étant donné, cependant, le fait signalé dans notre mémoire antérieur, qui met bien en évidence une influence de l'époque de l'année et de la température ambiante sur les courbes de durée, nous avons dû attendre de pouvoir vérifier les faits observés dans les séries d'expériences d'été, en répétant une nouvelle série d'observations faites pendant la saison plus fraîche.

Technique. — Pour la préparation de l'isolement de la moelle, ainsi que pour l'expérience proprement dite, c'est-à-dire, la technique du bain réfrigérant et l'observation des réflexes, nous avons procédé exactement comme dans les expériences antérieures. Qu'il nous soit permis simplement d'ajouter qu'il est possible de se faire une idée beaucoup plus claire de l'appareil employé pour le bain réfrigérant, en étudiant la figure et la description que l'on trouve dans un mémoire que nous venons de publier sur l'attaque épileptiforme par refroidissement brusque de la moelle (2). Il suffira donc de décrire ici la technique adoptée pour l'étude de l'action de l'anhydride carbonique et de l'oxygène.

On pourrait faire des expériences de ce genre, en laissant pendant quelque temps les animaux dans des atmosphères contenant des taux déterminés de CO_2 ou d'oxygène. Mais, une telle méthode présenterait un inconvénient sérieux: Il faudrait pratiquer l'opération d'isolement de la moelle, ou du moins la section du bulbe rachidien, en maintenant la Grenouille sous la cloche de respiration. En effet, le plus petit mouvement respiratoire dans l'air du laboratoire, rendrait illusoire toute action préalable de l'atmosphère étudiée. La pratique de la section de la moelle dans le but d'empêcher ces mouvements ne pourrait pas être acceptée, puisque par cette opération on supprimerait la respiration pulmonaire, et, réduit à la respiration cutanée, l'animal pourrait très bien ne pas se mettre en équilibre avec l'atmosphère dont l'action doit être éprouvée.

Nous avons donc adopté la technique de la respiration pulmonaire artificielle que nous pratiquons depuis longtemps (3), et que nous venons de rappeler dans un mémoire récent. Une canule fortement fixée dans la glotte de la Grenouille, est réliée par un tube en caoutchouc à l'un des flacons d'un système de vases communicants. Le gaz contenu dans ce flacon peut, par une simple manoeuvre de soulèvement de l'autre flacon, être insufflé dans les poumons de la Grenouille, qui se remplissent du mélange gazeux. Si l'on abaisse le flacon moteur, il y a une dépression dans l'autre flacon, les poumons se vident et le gaz est expiré. Le flacon et les poumons forment ainsi un système fermé.

Le flacon contenant le mélange gazeux a une capacité de 500 cc. On dispose donc, pour la respiration, d'un volume gazeux de 350 à 400 cc. Avant chaque expérience, le flacon est rempli d'un mélange gazeux déjà préparé et contenu dans un gazomètre. Ce mélange est analysé et, après chaque expérience on fait aussi l'analyse du mélange contenu dans le flacon qui a servi à la respiration artificielle. Il y a

toujours des altérations, dépendantes des échanges respiratoires de l'animal; ces altérations ne doivent pas dépasser certaines limites. Des écarts trop considérables indiqueraient que le système flacon-poumons n'est pas étanche et l'expérience serait à réjéter. Nous reviendrons dans un autre mémoire sur les altérations que l'on peut observer dans ce mélange qui a servi à la respiration artificielle. Dans cet article nous donnerons seulement les pourcentages de CO_2 ou d'oxygène déterminés au début de chaque expérience.

La respiration artificielle est pratiquée pendant 20 minutes. La Grenouille dispose encore de la respiration cutanée, mais il est possible, par la voie pulmonaire, d'établir les conditions que l'on veut. Une fois terminée la période de respiration artificielle, on laisse les poumons distendus et remplis par le mélange gazeux et on fait rapidement l'opération d'isolement de la moelle et du train postérieur. Jusqu'au moment de l'isolement des centres nerveux, ceux-ci ne reçoivent donc que du sang en équilibre avec le mélange gazeux employé pour la respiration artificielle. Toutes nos expériences furent réalisées à Rio de Janeiro avec des *Leptodactylus ocellatus*.

I. EXPÉRIENCES D'ÉTÉ

A. *Action de l'anhydride carbonique.* — Les expériences furent faites entre le 3 Février et le 4 Mars 1939, la température du laboratoire étant comprise entre 29 et 32°. On ajoutait du CO_2 et de l'oxygène pur à l'air de respiration, de manière telle que les pourcentages d'oxygène fussent toujours au-dessus d'un taux pouvant avoir une influence sur les résultats. Ainsi, les résultats observés sont bien dûs à l'action du CO_2.

Les courbes de la figure 1 représentent assez clairement les résultats de ces expériences. Elles nous dispenseront de faire reproduire les tableaux de chiffres expérimentaux. La courbe au trait plein est la réproduction de celle que nous avons déjà publiée dans notre mémoire antérieur. Elle représente les résultats d'une série de déterminations dans laquelle nous avons utilisé des Grenouilles ayant respiré de l'air atmosphérique pur, donc avec un pourcentage de CO_2 pratiquement nul. La courbe aux petits traits intercalés d'un point (—.—.—) représente les résultats de l'expérience du 27 Février 1939. La respiration artificielle fut faite dans chaque cas avec un mélange gazeux contenant 9 p. 100 de CO_2 et 83 p. 100 d'oxygène, pendant 20 minutes. Dans les deux prémieres déterminations, à 10°,8 et 15°,5, les réflexes disparus sont revenus quand la moelle fut transportée dans un bain de Ringer à la température ambiante. Dans toutes les autres déterminations, les réflexes disparus sont restés absents.

Dans le cas de la troisième courbe (aux points isolés.....), l'air de respiration contenait 15,2 p. 100 de CO_2. Les réflexes ne sont revenus que dans le cas des deux prémières déterminations, à 11°,3 et 16°. L'expérience fut faite le 28 Février 1939; la température du laboratoire était de 31°.

La quatrième courbe (—..—..—) résume les données de l'expérience du 3 Mars 1939. Température du laboratoire: 30°,5. Pourcen-

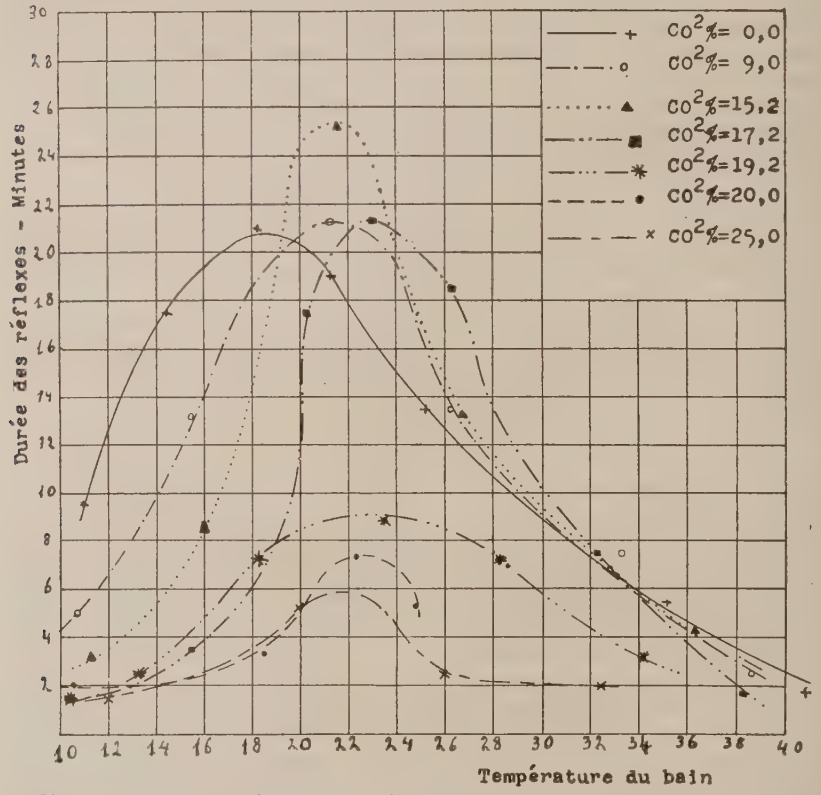


Fig. 1 — Courbes de résistence des réflexes, sous l'action de l'anhydride carbonique. Expériences d'été (Février, 1939).

tage de CO_2 dans l'air de respiration: 17,2. Pourcentage d'oxygène: 76,1. Comme pour les cas précédents, les réflexes sont restés absents après le retour à la température ambiante, dans toutes les déterminations autres que les deux prémières.

L'expérience du 4 Mars 1939 fut faite avec un air de respiration contenant 19,2 p. 100 de CO_2. Pourcentage d'oxygène: 61,62. La température du laboratoire était de 31,°7. Le retour des réflexes ne s'est fait que pour les trois prémières déterminations faites aux températures de 10°,4; 13°,3; 18°,3.

L'expérience du 18 Février, faite avec un mélange contenant 20 p. 100 de CO_2 et 73 p. 100 d'oxygène, se trouve représentée par la courbe aux petits traits réguliers (— — — —). Le retour des réflexes ne s'est produit que dans les cas des deux prémières déterminations, faites à 10°,6 et 18°,5.

Enfin, la dernière courbe représente les résultats d'une série de déterminations faites en utilisant des Grenouilles qui ont respiré un mélange contenant 25 p. 100 de CO_2. Les réflexes ne sont revenus en aucun cas.

L'action de l'anhydride carbonique dépend essentiellement de sa concentration. Jusqu'à 17,2 p. 100, dans les expériences ici résumées, la durée maxima de résistence n'a pas changé de valeur. Il semblerait que, tout en maintenant la même valeur approximative, le maximum s'est déplacé vers la droite, mais ce serait prématuré de faire dès maintenant une telle affirmation. La branche ascendante de la courbe montre, en revanche, des modifications nettes: elle se déplace vers la droite. Pour des températures égales du bain de Ringer, la durée de résistance des réflexes est d'autant plus réduite que le pourcentage de CO_2 préalablement respiré est plus elevée. Pour des pourcentages plus élevés de CO_2, la modification des phénomènes n'est plus limitée au seul déplacement de la branche gauche de la courbe vers la droite. La durée maxima se montre considérablement réduite, la branche de droite se déplace vers la gauche, l'aire comprise entre la courbe et l'axe des températures se rétrécit.

B. *Action des pourcentages réduits d'oxygène.* — Les courbes de la figure II nous montrent les résultats des expériences réalisées pendant l'été de 1939, en variant les pourcentages d'oxygène dans l'air qui servait préalablement à la respiration artificielle des animaux.

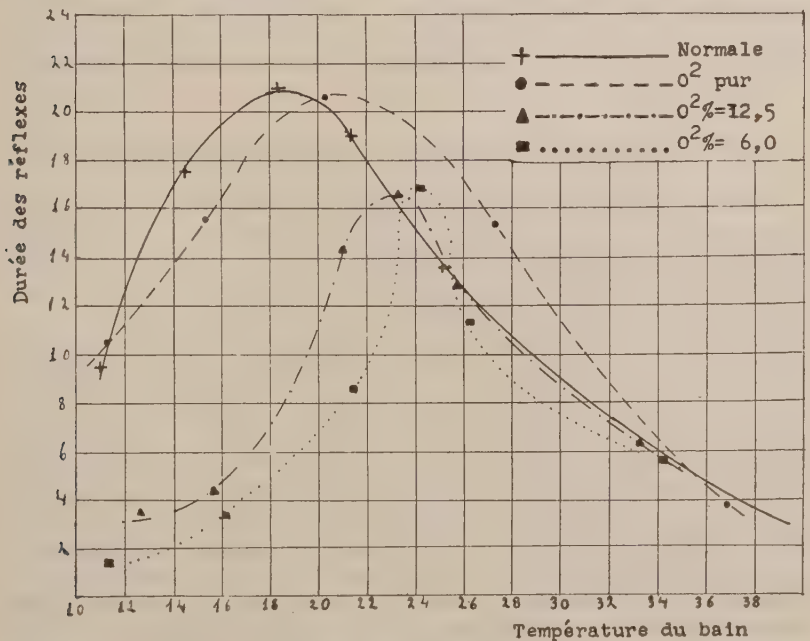


Fig. 2 — Courbes de résistence des réflexes, sous l'action de pourcentages variés d'oxygène. Expériences d'été.

La courbe au trait plein est la même qui nous a servi de courbe témoin dans les expériences précédentes.

Le tracé en petits traits séparés (— — — —) représente les résultats de la série de déterminations faites avec des Grenouilles ayant préalablement respiré de l'oxygène pur. La température du laboratoire était de 29°,2 ce jour-là. Les réflexes ne sont revenus que dans le cas de la prémière détermination faite à 11°,3.

Le tracé suivant (—.—.—) résume les résultats de la série du 6 Mars 1939. Les Grenouilles respiraient un mélange contenant 12,5 p. 100 d'oxygène, privé de CO_2. Le retour des réflexes, après l'épuisement et l'immersion dans le bain de Ringer à la température ambiante, ne fut constaté que pour les deux prémières déterminations, à 12°,7 et 15°,7. Température du laboratoire: 32°.

Le dernier tracé, en pointillé (....) représente les valeurs obtenues dans la série du 7 Mars 1939. La température du laboratoire était de 31°,5. L'air de respiration contenait 6 p. 100 d'oxygène, sans CO_2. Le retour des réflexes fut constaté seulement dans les deux prémières déterminations, faites aux températures de 11°,4 et 16°,1.

Dans les limites des pourcentages étudiés, l'action de l'oxygène peut être résumée comme il suit. La respiration préalable d'oxygène pur ne change pas la courbe des durées. Il y a entre les courbes données par des Grenouilles qui ont respiré seulement l'air atmosphérique pur, des écarts de l'ordre de ceux que l'on observe entre les courbes représentées dans la figure 2. Si le pourcentage d'oxygène est réduit on observe un déplacement de la branche de gauche de la courbe vers la droite. La durée maxima se réduit, la branche de droite ne se déplace pas sensiblement.

II. EXPÉRIENCES FAITES PENDANT LA SAISON FRAÎCHE

Nous avons repris l'étude de l'action de l'anhydride carbonique et de la réduction du pourcentage de l'oxygène, pendant le mois de Juin dernier. Les températures du laboratoire ont varié entre 23 et 26°, les températures moyennes de l'époque descendaient cependant bien au-dessous de ces températures observées dans l'après-midi.

Au cours des expériences il y a eu une certaine reprise de la chaleur ambiante, quoique arrivant à des températures bien inférieures à celles qui furent observées en été. Nous avons alors réalisé deux séries d'expériences témoins: l'une au début, le 2 Juin 1941 et l'autre à la fin, les 11, 12 et 13 Juin. Ces deux séries sont représentées par les courbes en trait plein et en petits traits réguliers (— — — —). La deuxième montre certaines irrégularités dans la position des points expérimentaux et, peut-être, une tendance à la réduction des durées.

Nous ne pouvions pas trop répéter les expériences, notre but étant simplement de vérifier si l'anhydride carbonique et l'oxygène exerçaient une influence semblable à celle que nous avions constaté dans les expériences d'été. Pour l'anhydride carbonique, nous nous sommes

contentés d'une seule série de déterminations, faite avec des Grenouilles qui avaient respiré un mélange contenant 13,5 p. 100 de CO_2. On voit que la branche de la courbe au-dessous du maximum se présente déjà nettement déplacée vers la droite. La durée maxima semble réduite, mais nous devons remarquer que cela peut être le résultat

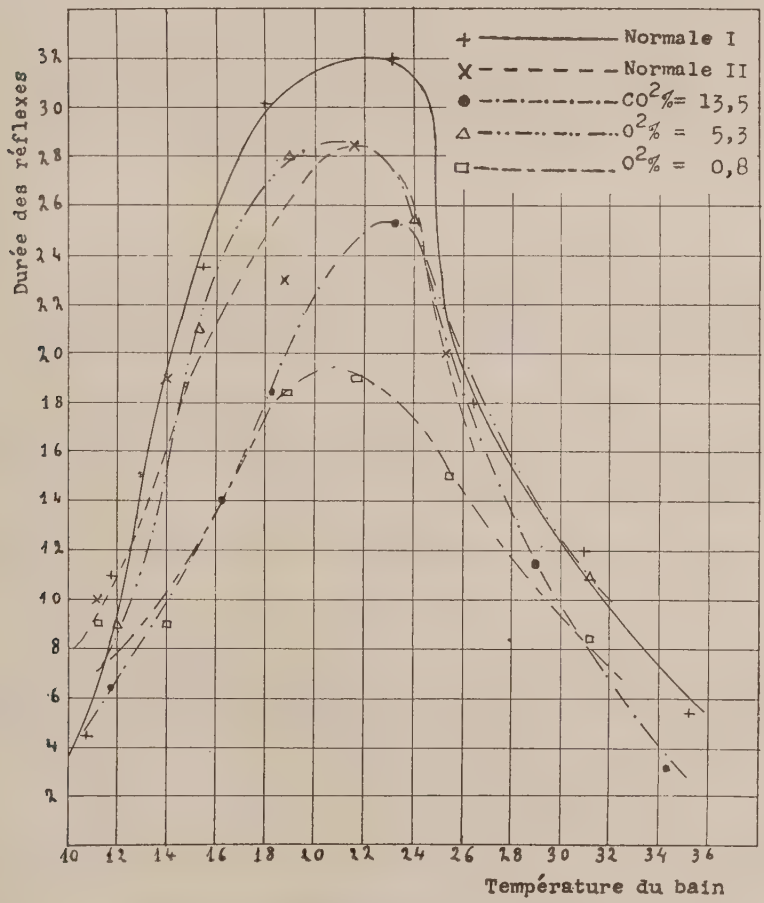


Fig. 3 — Expériences faites em Juin 1941.

simplement apparent du fait que l'on aurait dû faire une autre détermination entre 20 et 22°. Il y a là une lacune.

L'action de la réduction du taux d'oxygène fut beaucoup moins sensible à cette époque. En effet, tandis que dans les séries d'été, un mélange contenant 12,5 p. 100 d'oxygène montrait déjà nettement son action, au mois de Juin, la série de déterminations faites avec 5,3 p. 100 d'oxygène coincide avec le courbes des séries témoins. En pratiquant des déterminations avec des Grenouilles qui avaient respiré

pendant 20 minutes une atmosphère presque entièrement dépourvue d'oxygène (contenant 0,8 p. 100 de 0_2), nous avons obtenu la courbe en traits alternés. La durée maxima se montre réduite, on remarque un certain déplacement de la branche de gauche et un déplacement à peine esquissé de la branche de droite.

Dans les séries de 1939, nous avions déjà obtenu des résultats qui montraient cette réduction de l'influence de la privation de l'oxygène dans les expériences d'hiver. Une série faite le 14 Avril avec un mélange contenant 4,4 p. 100 d'oxygène, se trouve placée tout près de la série témoin faite le lendemain. Celle-ci a présenté certaines irrégularités. La température maxima du laboratoire fut de 28° et 28°,5.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1. Dans ce mémoire, nous exposons les résultats des déterminations des durées des réflexes de la préparation moelle isolée-train postérieur, en fonction de la température du bain où se trouve plongée la moelle isolée, les Grenouilles ayant préalablement respiré, par insufflation pulmonaire, des mélanges contenant de l'anhydride carbonique et de l'oxygène dans des pourcentages déterminés.

2. L'anhydride carbonique, au-dessus d'une certaine limite, donne en résultat des altérations des courbes de résistence des réflexes. De même, quand la tension de l'oxygène tombe au-dessous de certaines limites, on constate des déformations des courbes. Ces altérations sont décrites dans le texte du mémoire et réprésentées dans les graphiques.

3. L'action de la réduction de l'oxygène est beaucoup moins sensible dans les expériences réalisées pendant l'époque fraîche de l'année et plus forte dans les séries d'été.

RESUMO E CONCLUSÕES

1. Na memória acima, expõem os AA. os resultados das determinações de duração dos reflexos da preparação medula isolada-trem posterior da Rã em função da temperatura do banho de Ringer em que é mergulhada a medula isolada, tendo previamente as Rãs respirado, por insuflação pulmonar, misturas contendo anidrido carbônico e oxigênio em proporções determinadas.

2. O anidrido carbônico, acima de certo limite, dá em resultado alterações das curvas de resistência dos reflexos. Tambem, quando a tensão de oxigênio cai abaixo de certos limites, verificam-se alterações das curvas. Todas essas alterações encontram-se descritas no texto da memória e representadas nos gráficos.

3. A ação da redução do oxigênio é muito menos sensivel nas experiências realizadas durante o inverno e muito mais intensa nas experiências de verão.

CITATIONS BIBLIOGRAPHIQUES

1. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1941. Action de la température sur le maintien et la résistence des réflexes de la préparation moelle-train postérieur de la Grenouille. *Rev. Brasil. Biol.*, 1 (1): 95-102.

2. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1941. Recherches sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle épinière. Premier Mémoire. Introduction et technique. *Rev. Brasil. Biol.*, 1 (2): 135-177.

3. OZORIO DE ALMEIDA, M. & FIALHO, B. de A., 1923. Sur l'anesthésie des Grenouilles. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 89: 1258-1259.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 301-304
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

DIFENILHIDANTOINATO DE SÓDIO E EPILEPSIA EXPERIMENTAL

I. Ação sobre as convulsões produzidas pelo resfriamento brusco e pela excitação química direta da medula espinhal da rã [1]

H. MOUSSATCHÉ

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

O emprego do difenilhidantoinato de sódio como substância de ação anticonvulsivante data dos trabalhos de PUTNAM & MERRITT (1) que fizeram um estudo comparativo de diversas substâncias sobre as convulsões provocadas pela excitação elétrica da cortex cerebral de gatos; estes autores verificaram ser a difenilhidantoina, a acetofenona e a benzofenona, entre as substâncias experimentadas, as que mostraram maior poder anti-convulsivante com um relativamente pequeno efeito hipnótico. Ulteriormente, estes resultados experimentais, no que concerne a difenilhidantoina, foram comprovados na clínica, não só pelos mesmos autores (2), como por numerosos outros. Efeitos farmacológicos sobre a pressão arterial, ritmo respiratório, musculatura do útero da coelha, etc., já foram descritos nos trabalhos de DRAKE, HAURY & GRUBER (3, 4). Faremos no presente trabalho a exposição dos resultados obtidos com o emprego do difenilhidantoinato de sódio nas convulsões experimentais da rã que atualmente são objeto de estudo em nosso laboratório.

MÉTODO

Empregamos para estudo a rã *L. ocellatus*. Como já foi descrito anteriormente por M. OZORIO DE ALMEIDA (5), o resfriamento brusco da medula dessa espécie de rã dos arredores do Rio de Janeiro, a uma temperatura abaixo de 8° C., produz um forte ataque epileptiforme. Este ataque é de uma constância extremamente grande, quando se observam as condições necessárias. Em um número de experiências que já sobe a alguns milhares, o ataque sempre se produziu. Uma descrição mais minuciosa do fenômeno é dada em uma série de memórias recentes (6). Queremos, porem, desde já assinalar que o limite superior de temperatura é variavel com a região em que vive a rã. Como foi as-

[1] Recebido para publicação a 18 de Julho de 1941.
Trabalho do Laboratório de Fisiologia do Instituto Oswaldo Cruz.

sinalado por M. Ozorio de Almeida, o limite superior das rãs de Buenos-Aires é de cerca de 5°, o das rãs de Recife de 12° e nas rãs norte-americanas (*R. pipiens*), assim como nas rãs européias (*R. temporaria*), o ataque só é obtido pelo resfriamento com o cloreto de etila, por encontrar-se o limite abaixo de 0°. No ataque por excitação química (7) direta a medula era exposta pela abertura de 3 ou 4 arcos vertebrais algumas horas antes de executar a experiência. A excitação era feita com uma solução a 20% de cloreto de sódio. O difenilhidantoinato de sódio é obtido pela combinação da difenilhidantoina com o hidróxido de sódio em proporções equivalentes; sua maior solubilidade torna mais prático o seu emprego. A solução era injetada no saco linfático ventral com a antecedência desejada. As doses empregadas variaram entre 0,05 grs. e 0,90 grs. por quilograma de animal. O tempo entre a injeção da solução e o resfriamento da medula da preparação oscilou de 30 minutos a 72 horas. Em alguns casos o resfriamento foi efetuado com o cloreto de etila.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nem sempre foram de grande constância. Todas as rãs injetadas com doses entre 0,05 e 0,09 grs. por Klg. deram ataque. Os períodos latentes estiveram sempre dentro dos limites normais. A vivacidade das rãs não se alterou. As doses de 0,10 à 0,15 grs. aboliram o ataque na grande maioria dos casos sem alterar sensivelmente a vivacidade das rãs. Em alguns casos notava-se ligeira incoordenação no salto e, depois de saltar, quando pousavam novamente no solo, uma acentuada inclinação para um dos lados que durava certo tempo. Os reflexos espinhais conservavam-se na preparação medula isolada-trem posterior com a vivacidade normal havendo mesmo, às vêzes, uma excitabilidade exagerada. Na temperatura ambiente o tempo de duração dos reflexos em flexão da pata posterior encontrava-se nos limites normais. Em algumas rãs em que o ataque não se apresentava depois do resfriamento da medula, uma excitação reflexa provocava um ataque de predominância tônica e de curta duração. Quando não havia ataque os reflexos conservavam-se ainda vários minutos. O reflexo do salto (8) na preparação isolada era normal ou exaltado. O resfriamento da medula com cloreto de etila provocou ataque de intensidade diminuida em rãs nas quais o simples resfriamento no banho de Ringer à temperatura habitual de ataque foi ineficaz.

Experiência de 3 de Junho de 1941 — Rã com 29 grs. Injeção no saco linfático ventral de 0,0044 grs. de difenilhidantoinato de sódio (0,15 grs. por Klgr.), às 15,33 horas.

4 de Junho de 1941 — 11,55 horas — Rã muito viva. Certa incoordenação no salto. Preparação medula-trem posterior. Reflexos vivos e normais. Tempo 0′ — Início do resfriamento com cloreto de etila; 1′ — ataque com características normais; 2′ — medula em Ringer a temperatura ambiente; 4′ — medula em Ringer a temperatura de 0°; 13′ — não houve ataque. Medula novamente em Ringer ambiente; 15′ — reflexos normais fracos.

Experiência de 18 de Junho de 1941 — Rã com 40 grs. Injeções no saco linfático ventral de 0,006 grs. de difenilhidantoinato de sódio (0,15 grs. por Klgr.), às 14,04 horas.

19 de Junho de 1941 — Rã com vivacidade normal. Preparação medula trem posterior. Reflexos espinhais vivos e normais. Tempo: 0′ — medula mergulhada em Ringer à 3°; 1′ — pequenos tremores das pontas dos dedos que desapareceram em poucos segundos; 6′ — Ringer a 3°,5; 6′,30″ — medula em Ringer à temperatura ambiente; os reflexos voltaram vivos e normais; resfriamento com cloreto de etila; 8′ — ataque fraco.

A duração do efeito impediente sobre o ataque é relativamente longa. Como é possivel notar nos protocolos acima, cerca de 24 horas depois o ataque ainda estava inibido. Com a dose de 0,30 grs. por Klgr. não obtivemos ataque 3 dias depois da injeção.

Empregando doses mais elevadas (0,20 à 0,90) a depressão acentuava-se bastante e permanecia vários dias. Mesmo em forte estado de depressão a preparação medula-trem posterior mostrava os reflexos muito vivos, sendo que nas doses mais altas, já se nota uma tendência a extensão. Não verificamos a dose mortal mínima, mas acima de 0,70 grs algumas rãs eram encontradas mortas. No ataque por excitação química direta da medula nos limitamos a determinar em que dose os efeitos impedientes começam a se manifestar verificando que elas se aproximam das encontradas para o resfriamento brusco, isto é, 0,10 à 0,15 grs. por Klgr. de pêso de animal.

Como assinalamos no início os resultados não foram sempre de grande constância; rãs injetadas com as mesmas doses e em tempos diferindo de cerca de 1 minuto, apresentavam resultados discordantes; em um grupo de rãs injetadas com doses de efeito anticonvulsivante largamente manifestado em outras experiências, o ataque aparecia com todos os seus característicos, mesmo deixando a substância agir longo tempo. Não investigamos por enquanto a causa destas discordâncias acidentais, mas, julgamos estarem ligadas à pouca estabilidade das soluções de difenilhidantoinato de sódio. Estas pequenas discordâncias não alteram porém as conclusões, dada a constância com que o ataque se apresenta nas condições normais e, portanto, a segurança que os resultados positivos oferecem.

Usamos a difenilhidantoina preparada pelo Lab. Paulista de Biologia. Queremos agradecer ao Dr. Q. Mingoja que gentilmente poz à nossa disposição a quantidade desejada e ao Dr. H. Cardoso da Secção de Química do Instituto pela sua colaboração.

CONCLUSÕES

1.°) O difenilhidantoinato de sódio tem uma ação sobre a medula que se manifesta pelo impedimento do ataque pelo resfriamento brusco ou pela excitação química direta da medula espinhal.

2.°) Os reflexos espinhais de flexão da pata e do salto conservam-se normais.

3.°) As doses impedientes oscilaram entre 0,10 e 0,15 grs. por Klgr. de pêso.

4.°) Estas doses não apresentam ainda uma ação depressora geral acentuada das funções nervosas gerais.

CONCLUSIONS

1.º) Le diphenylhydantoinate de sodium agit sur la moelle épinière en enpêchant la production des attaques par le refroidissement brusque ou par l'excitation chimique directe.

2.º) Le réflexe spinal en flexion ainsi que le réflexe du saut ne sont pas abolis par cette substance; ils restent à peu prés normaux.

3.º) Les doses qui enpêchent l'attaque se trouvent entre 0,10 et 0,15 grs. par Kilo.

4.º) Ces doses ne present pas encore une action déprimente marquée sur les fonctions nerveuses générales.

BIBLIOGRAFIA

1. PUTNAM, T. J. & MERRIT, H. H., 1937, Experimental determination of the anticonvulsivant properties of some phenylderivatives. *Science,* 85: 525-526.

2. MERRIT, H. H. & PUTNAM, J. T., 1938, Sodium diphenyl Hydantoinate in treatment of convulsive disorders. *J. Amer. Med. Assoc.*, 111: 1068-1073.

3. DRAKE, M. E., HAURY, V. G. & GRUBER, C. M., 1939, The actions of sodium diphenyl hydantoinate (Dilantin) on the excised and intact uterus .*Arch. int. Pharmacodyn.*, 63: 288-291.

4. HAURY, V. G. & DRAKE, M. E., 1940, The effects of intravenous injections of sodium diphenyl hydantoinate (Dilantin) on respiration, blood pressure and the vagus nerve. *J. Pharm.*, 68: 36-40.

5. OZORIO DE ALMEIDA, M., 1933, Sur une attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle de la Grenouille. *C. R. Soc. Biol., Paris,* 115: 78-80.

6. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1941, Recherches sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle épinière. *Rev. Brasil. Biol.*, 1 (2): 165-194.

7. MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1938, Sur une attaque convulsive produite par l'excitation chimique directe de la moelle épinière chez la grenouille brésilienne. *C. R. Soc. Biol., Paris,* 129: 995-997.

8. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, 1940, Sur le réflexe du saut chez la Grenouille. *C. R. Soc. Biol.*, 133: 713-716.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 305-310
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

SOBRE A ASTENOBIOSE DO "PHLEBOTOMUS WHITMANI" ANTUNES E COUTINHO, 1939 (Diptera, Psychodidae) [1]

MAURO PEREIRA BARRETTO

Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo

Em trabalho anterior (Barretto, 1941) estudando as gerações das fêmeas de *Phlebotomus whitmani* capturadas na natureza, mostrámos que este díptero pertence ao tipo fisiológico de insetos heterodinâmicos: enquanto certos indivíduos evoluem regular e rapidamente de ovo a ímago, outros indivíduos da mesma geração, chegados ao quarto estádio larval, têm a sua evolução interrompida, ficando em estado de torpor durante um período mais ou menos longo; em dado momento, estas larvas tórpidas ou astênicas recuperam espontaneamente a atividade normal e se transformam em pupas que evoluem normalmente. Mostrámos ainda que: 1) esta heterodinamia, como no *Phlebotomus papatasii,* é acíclica; 2) o fenômeno do torpor espontâneo é independente das condições exteriores de temperatura e humidade.

Continuando as investigações sobre o assunto, pudemos observar este curioso fenômeno em gerações das fêmeas nascidas em laboratório e provenientes ou não de larvas astênicas.

Apresentaremos abaixo os resultados das nossas observações.

GERAÇÕES DAS FÊMEAS NASCIDAS DE LARVAS NÃO ASTÊNICAS

Acompanhando a evolução de culturas obtidas a partir de ovos postos por fêmeas nascidas de larvas não astênicas, pudemos verificar o fenômeno da astenobiose 4 vêzes. Daremos abaixo, em resumo, a evolução destas culturas.

1) *Cultura (265) 1.* — Fêmea nascida em laboratório de larva não astênica, mas em cultura onde foi observado o fenômeno com larvas da mesma ge-

---

[1] Recebido para publicação a 21 de Julho de 1941.
Trabalho do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Diretor: Prof. Dr. S. B. Pessôa) realizado sob os auspícios da Comissão de Estudos da Leishmaniose do Departamento de Saúde do Estado de S. Paulo e apresentado à sessão de 4.VI.41 da Secção de Higiene e Moléstias Tropicais e Infectuosas da Associação Paulista de Medicina.

ração. Esta fêmea recebeu um repasto sanguíneo, em 18-III-40, após a cópula e efetuou a postura em 25-III-40 (32 ovos). Os ovos eclodiram em 4-IV-40 e as larvas, alimentadas com mistura de limo e terra, sofreram a primeira muda em 11-IV-40 e 12-IV-40; passaram para o terceiro estádio entre 17-IV-40 e 20-IV-40 e para o quarto estádio entre 21-IV-40 e 30-IV-40. De 20 larvas que chegaram ao quarto estádio, 14 evoluiram normalmente, sofreram a quarta muda e deram adultos dentro de 8-10 dias; 6 larvas entraram em astenobiose vindo a primeira a pupar somente em 4-VIII-40 (quadro I).

Temperatura em que foi mantida a cultura: 25,0-27,0° C.

Percentagem de larvas astênicas: 20 %.

2) *Cultura (265-5) 1.* — Fêmea nascida em laboratório de larva não astênica mas em cultura onde foi observado o fenômeno da astenobiose com larvas da mesma geração. Esta fêmea efetuou um repasto sanguíneo, em 25-III-40, após a copula e fez uma postura de 28 ovos em 2-IV-40. Os ovos eclodiram em 12-IV-40 e as larvas, alimentadas com mistura de limo e terra, passaram para o segundo estádio entre 20-IV-40 e 23-IV-40, para o terceiro estádio entre 25-IV-40 e 30-IV-40 e para o quarto estádio 2-V-40 e 12-V-40. De 17 larvas que chegaram ao quarto estádio, 9 evoluiram normalmente e 8 entraram em astenobiose (quadro I).

Temperatura em que evoluiu a cultura: 25,0-27,0° C.

Percentagem de larvas astênicas: 47,59 %.

3) *Cultura (291-6) 1.* — Fêmea nascida em laboratório de larva não astênica e em cultura onde o fenômeno da astenobiose não foi observado. Alimentada com sangue em 13-IV-40, após o acasalamento, esta fêmea efetuou uma postura em 18-IV-40 (39 ovos). Os ovos eclodiram em 1-V-40 e as larvas, alimentadas com limo e terra, sofreram a primeira muda entre 11-V-40 e 13-V-40, a segunda muda entre 19-V-40 e 24-V-40 e a terceira muda entre 25-V-40 e 8-VI-40. De 26 larvas que atingiram o quarto estádio, 17 evoluiram normalmente e 9 ficaram estacionárias (quadro I).

Temperatura que foi mantida a cultura: 19,0-23,2° C.

Percentagem de larvas astênicas: 32,14 %.

4) *Cultura (408-3) 4.* — Fêmea nascida em laboratório de larva não astênica e em cultura onde o fenômeno da astenobiose não foi observado. Após o acasalamento, esta fêmea foi alimentada com sangue em 20-IX-40 depois de ter sido alimentada com solução de glicose a 10 %. Em 26-IX-40 ela efetuou uma postura (32 ovos) e os ovos eclodiram em 6-X-40. As larvas, alimentadas com limo e terra, passaram para o segundo estádio em 16-X-40 e 17-X-40, para o terceiro estádio entre 23-X-40 e 30-X-40 e para o quarto estádio entre 3-IX-40 e 15-XI-40. De 24 larvas que chegaram ao quarto estádio, 22 evoluiram normalmente e 2 entraram em diapausa (quadro I).

Temperatura em que foi mantida a cultura: 18,0-23,2° C.

Percentagem de larvas astênicas: 8,33 %.

No quadro I mostramos a evolução das larvas astênicas das culturas acima mencionadas:

QUADRO I

Astenobiose do *P. whitmani;* larvas provenientes de ovos postos por ♀♀ da 1.ª geração de laboratório que não se mostraram astênicas na sua evolução

Número da cultura	*N.º da larva*	*Data da 3ª muda 4º estádio*	*Temperatura em que entraram em diapausa*	*Temperatura durante a diapausa*	*Data da pupação*	*Duração da diapausa*
	1					
(265-1) 1	2	21-4-40	20,2-25,5ºC	18,2-24,2ºC	4-8-40	105 dias
	3	»	» »	» »	morreu	——
	4	»	» »	» »	7-8-40	108 dias
	5	»	» »	» »	15-8-40	116 "
	6	»	» »	» »	16-8-40	117 "
		»	» »	» »	2-9-40	134 "
(265-5) 1	1	2-5-40	25,0-27,0ºC	18,0-24,2ºC	10-9-40	131 dias
	2	»	» »	» »	7-8-40	97 "
	3	»	» »	» »	não pupou	——
	4	»	» »	» »	25-9-40	146 dias
	5	»	» »	» »	1-10-40	152 "
	6	»	» »	» »	20-9-40	141 "
	7	»	» »	» »	30-8-40	120 "
	8	»	» »	» »	14-9-40	135 "
(291-6) 1	1	25-5-40	19,0-23,2ºC	18,2-24,2ºC	morreu	——
	2	»	» »	» »	8-10-40	136 dias
	3	»	» »	» »	15-10-40	143 "
	4	»	» »	» »	17-11-40	176 "
	5	»	» »	» »	morreu	——
	6	»	» »	» »	20-10-40	148 dias
	7	»	» »	» »	15-11-40	174 "
	8	»	» »	» »	26-10-40	154 "
	9	»	» »	» »	morreu	——
(408-3) 4	1	3-11-40	18,0-23,2ºC	20,5-28,5ºC	2-3-41	119 dias
	2	»	» »	» »	13-2-41	102 "

Os resultados acima apresentados evidenciam que o fenômeno da astenobiose aparece nas gerações de fêmeas criadas em laboratório como nas de fêmeas capturadas vivas na natureza. Nas gerações de fêmeas criadas em laboratório o fenômeno pode ser observado na descendência de fêmeas provenientes de larvas não astênicas, em culturas onde as larvas irmãs se mostraram ou não astênicas.

GERAÇÕES DAS FÊMEAS NASCIDAS DE LARVAS ASTÊNICAS

Procurando estudar as gerações das fêmeas nascidas de larvas astênicas, acompanhámos a evolução de cinco culturas, cujos protocolos resumiremos abaixo.

1) *Cultura (265-1) b.* — Fêmea nascida em laboratório em 30-VI-40, foi acasalada e alimentada com sangue em 3-VII-40. Os ovos (22) eclodiram em 23-VII-40 e as larvas, alimentadas com limo e terra, sofreram a primeira muda entre 2-VIII-40 e 4-VIII-40, a segunda muda entre 9-VIII e 14-VIII-40 e a terceira muda entre 15-VIII-40 e 23-VIII-40. De 14 larvas chegadas no quarto estádio, 10 evoluiram normalmente, puparam entre 23-VIII-40 e 13-IX-40 e 12 a 14 dias depois deram adultos. Duas larvas morreram e duas entraram em diapausa (quadro II).

Temperatura em que foi mantida a cultura: 18,2-24,0° C.
Percentagem de larvas estênicas: 20 %.

2) *Cultura (265-1) e.* — Fêmea nascida em laboratório em 13-VII-40, foi alimentada com sangue em 17-VII-40, após o acasalamento. Os ovos (21) postos em 25-VII-40 eclodiram em 7-VIII-40 e as larvas, alimentadas com limo e terra, sofreram a primeira muda entre 17-VIII-40 e 20-VIII-40, a segunda muda entre 24-VIII-40 e 29-VIII-40 e a terceira muda entre 30-VIII-40 e 13-IX-40. Nove larvas chegaram ao quarto estádio e evoluiram normalmente pupando entre 8-IX-40 e 25-IX-40 e dando adultos 13 e 16 dias depois. Nenhuma larva apresentou o fenômeno da astenobiose.

3) *Cultura (265-5) b.* — Fêmea nascida em laboratório em 23-VI-40, acasalada e alimentada com sangue em 26-VI-40. Os ovos (19), postos em 3-VII-40, eclodiram em 12-VII-40 e as alimentadas com limo e terra, sofreram a primeira muda em 18-VII-40 e 19-VII-40, a segunda muda entre 23-VII-40 e 30-VII-40 e a terceira muda entre 27-VII-40 e 7-VIII-40. De 12 larvas que chegaram ao quarto estádio, 7 evoluiram normalmente, puparam entre 3-VIII-40 e 16-VIII-40 e deram adultos 9 a 11 dias depois; cinco ficaram estacionárias (quadro II).

Temperatura em que foi mantida a cultura: 25,0-27,0° C.
Percentagem de larvas astênicas: 41,66 %.

4) *Cultura [(291-6) 1] 8.* — Fêmea nascida em laboratório em 6-XI-40 foi alimentada com solução de sacarose a 10 % em 8-XI-40, acasalada e alimentada com sangue em 10-XI-40. Os ovos (29) eclodiram em 20-XI-40 e as larvas, alimentadas com limo e terra, passaram para o segundo estádio em 28-XI-40 e 29-XI-40, para o terceiro estádio entre 2-XII-40 e 5-XII-40 e para o quarto estádio entre 6-XII-40 e 12-XII-40. De 20 larvas que chegaram ao quarto estádio, 3 morreram e 14 evoluiram normalmente sofrendo a quarta muda entre 12-XII-40 e 21-XII-40 e dando adultos 8-9 dias depois; 3 larvas, porém, entraram em astenobiose (quadro II).

Temperatura em que foi mantida a cultura: 20,5-28,0° C.
Percentagem de larvas astênicas: 15 %.

5) *Cultura (265-6) a.* — Fêmea nascida em laboratório em 8-VI-40, acasalada em 9-VI-40 e alimentada com sangue em 11-VI-40. Os ovos (14) postos em 18-VI-40 eclodiram em 27-VI-40 e as larvas, alimentadas com limo e terra, sofreram a primeira muda entre 3-VII-40 e 5-VII-40, a segunda muda entre 8-VII-40 e 14-VII-40 e a terceira muda entre 13-VII-40 e 24-VII-40. Sete larvas que chegaram ao quarto estádio evoluiram normalmente, puparam entre 20-VII-40 e 8-VIII-40 e deram 6 adultos entre 30-VII-40 e 19-VIII-40, nenhuma se mostrando astênica.

Temperatura durante a experiência: 26,0-27,0° C.

No quadro II apresentamos, em resumo, a evolução das larvas astênicas das experiências anteriores.

QUADRO II

Astenobiose do *P. whitmani;* geração de ♀♀ nascidas de larvas astenobióticas

Número da cultura	*N.º da larva*	*Data da 3ª muda 4º estádio*	*Temperatura em que entraram em diapausa*	*Temperatura durante a diapausa*	*Data da pupação*	*Duração da diapausa*
(265-1) b	1	15-8-40	18,2-23,0°C	18,0-28,0°C	23-12-40	130 dias
	2	»	» »	» »	1-12-40	108 "
(265-5) b	1	27-7-40	25,0-27,0°C	18,0-28,0°C	15-12-40	141 dias
	2	»	» »	» »	morreu	——
	3	»	» »	» »	10-11-40	106 dias
	4	»	» »	» »	1-12-40	127 "
	5	»	» »	» »	morreu	——
[(291-6) 1]8	1	6-12-40	20,5-28,0°C	23,5-28,5°C	27-2-41	83 dias
	2	»	» »	» »	morreu	——
	3	»	» »	» »	30-3-41	114 dias

A análise dos resultados acima apresentados mostra que a descendência de fêmeas nascidas de larvas astênicas, pode ou não apresentar evolução tórpida.

O fenômeno da astenobiose no *Phlebotomus whitmani* é relativamente raro.

A percentagem de larvas astênicas é muito variavel podendo, às vêzes atingir cifras elevadas (47,59 %).

A duração da diapausa, contada a partir da data em que as larvas passaram para o quarto estádio, varia entre 83 e 174 dias.

Demais, o fenômeno da astenobiose independe das condições exteriores de temperatura ao contrário do que verificou Roubaud (1927, 1928 a) para o *Phlebotomus papatasii*. Ele independe das condições higrométricas dos meios de cultura concordando, neste particular, os nossos resultados com os daquele autor.

Nossas observações não confirmam a afirmação de Roubaud (1928 b, 1928 c) de que a causa determinante do aparecimento das larvas astênicas é uma intoxicação dos ovos condicionada pela sua anormal permanência no interior do abdomen materno. O fenômeno foi ora observado ora não, em larvas provenientes de ovos postos, decorrido igual número de dias depois do repasto sanguínio. Neste particular, estamos com Theodor (1934) que observou fato semelhante com o *Phlebotomus papatasii* na Palestina.

Ainda, as nossas verificações não confirmam as de THEODOR (1934) que atribue a evolução tórpida das larvas a uma deficiente alimentação, entre outras causas.

Em suma, os resultados agora apresentados, estão de acôrdo com os que haviamos obtido trabalhando com fêmeas capturadas na natureza.

SUMÁRIO

O autor estuda o fenômeno da astenobiose em gerações das fêmeas de *Phlebotomus whitmani* criadas em laboratório.

Suas verificações confirmam e ampliam os resultados observados em gerações das fêmeas capturadas na natureza.

SUMMARY

Another study of asthenobiosis was undertaken by the author. Generations of laboratory bred females of *Phlebotomus whitmani* Antunes et Coutinho, 1939 were used this time.

His findings confirm and, at the same time, enlarge results observed with generations of females captured "in natura".

BIBLIOGRAFIA

BARRETTO, M. P., 1941, Observações sobre a biologia do *Phlebotomus whitmani* Antunes e Coutinho, 1939 (*Diptera, Psychodidae*) em condições experimentais. *Papéis Avulsos Dept. Zool. Est. S. Paulo.*, 1: 87-100.

ROUBAUD, E., 1927, L'hétérodynamie et le rôle de l'athermobiose dans le cycle évolutif de *Phlebotomus pappatasii*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 20: 613-619.

ROUBAUD, E., 1928*a*, Longue durée de l'asthenobiose pseudo-hivernal chez *Phlebotomus pappatasii;* action réactivante de l'athermobiose prolongée. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 21: 107-108

ROUBAUD, E., 1928*b*, Asthénobiose et hibernation obligatoire provoquées, chez *Phlebotomus pappatasii*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 21: 436-439.

ROUBAUD, E., 1928*c*, L'influence maternelle dans le déterminisme de l'asthenobiose acyclique; métagonie et réactivants métagoniques. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 186: 1236-1238.

THEODOR, O., 1934, Observations on the hibernation of *Phlebotomus papatasii* (Dipt.) *Bull. Ent. Res.*, 25: 459-472.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 311-319
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

NOTA SÔBRE UM FLAGELADO PARASITA DE ANOFELINOS DO SUB-GÊNERO "NYSSORHYNCHUS", "HERPETOMONAS PESSOAI" N. SP. (Mastigophora, Trypanosomidae) [1]

A. L. AYROZA GALVÃO e J. O. COUTINHO
Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo

(Com 5 figuras no texto)

Em Janeiro do corrente ano, em Vila Queiroz, onde é alta a incidência de leishmaniose cutâneo-mucosa, tivemos ocasião de encontrar, num total de 123 anofelinos dissecados, 6 com flagelados no tubo digestivo, que classificamos no gênero *Herpetomonas,* por apresentarem formas em tripanosoma, em critídia, em leptômonas e em leishmânia. Como não encontramos na literatura, tanto no catálogo de SPEER (1927), como no trabalho de THOMSON e ROBERTSON (1925), e outros subsequentes, nenhuma *Herpetomonas* com os caracteres apresentados por este flagelado, propomos para ele o nome de *Herpetomonas pessoai* n. sp. em homenagem ao prezado amigo e mestre Prof. S. B. PESSÔA.

Damos a seguir, no quadro I as espécies de anofelinos dissecados e respectivos índices de infestação por *Herpetomonas pessoai.*

QUADRO I

ESPÉCIE	*Número de exemplares*	*Negativo*	*Positivo*	*%*
A. oswaldoi noroestensis	1	1	0	0,0
A. oswaldoi	14	14	0	0,0
Anopheles sp. provavelmente *A. oswaldoi* ..	68	63	5	7,35
A. triannulatus davisi	29	28	1	3,44
A. strodei	4	4	0	0,0
A. albitarsis	7	7	0	0,0
TOTAL	123	117	6	4,87

[1] Recebido para publicação a 21 de Julho de 1941.
Trabalho do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Diretor: Prof. Dr. S. B. Pessôa) feito sob os auspícios da Comissão de Estudos da Leishmaniose do Departamento de Saúde do Estado de S. Paulo e apresentado à Sociedade de Biologia de S. Paulo, sessão de 8-6-1941.

Dos anofelinos parasitados por estes flagelados, nenhum se apresentou com os ovários maduros, parecendo se tratar de um parasitismo real, em que estes organismos têm acentuada ação patogênica sôbre

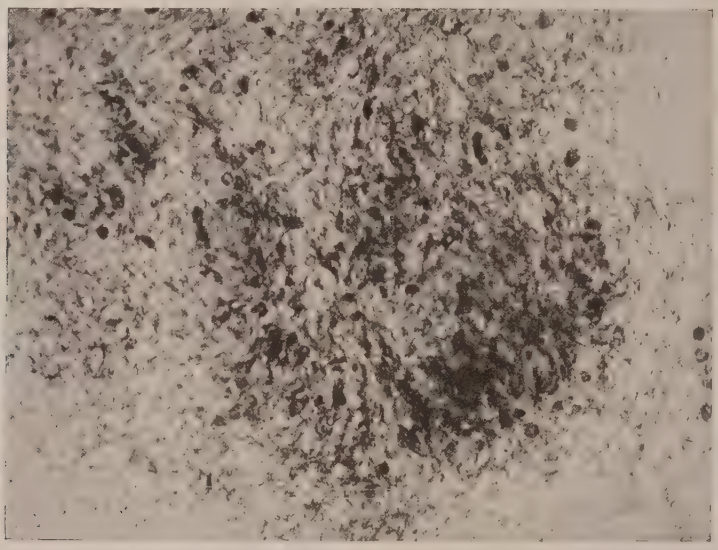


Fig. 1 — Conglomerado de flagelados em torno de células epiteliais do estômago do anofelino. D. Lili Ebstein fotogr. (Serv. Desenho Fac. Med. Univ. S. Paulo).

Fig. 2 — Ovos de *A. oswaldoi* de um espécimen com o 2º tarso posterior com cêrca de 25% de negro basal, proveniente de Itapira, S. Paulo, segundo Galvão, 1940.

o mosquito, revelada pela friabilidade dos estômagos e pelo grande acúmulo de parasitas nas suas células epiteliais, como poude ser perfeitamente apreciado pelo exame a fresco e em preparação (Fig. 1). E' lícito pois se supôr que tal ação patogênica tenha impedido o amadurecimento dos ovários, pois em todos os mosquitos que ovipuzeram, o tubo digestivo se apresentava intato e livre de parasitas. Nos parasitados o número verdadeiramente espantoso de flagelados, enxameando o tubo digestivo, que por eles fica bloqueado, tambem é uma prova disto.

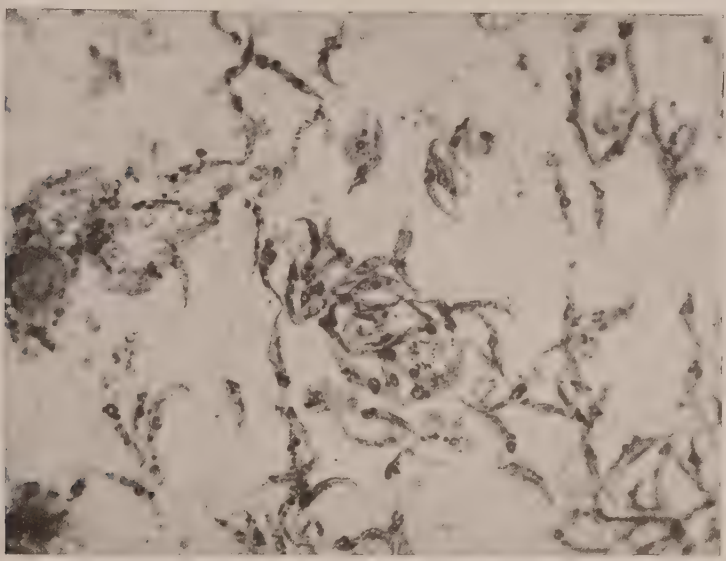


Fig. 3 — Formas em critídia e em tripanosoma e raras em leptômonas e em leishmania de *Herpetomonas pessoai* n. sp. D. Lili Ebstein fotog. (Serv. Des. Fac. Med. Univ. S. Paulo).

Como todos os anofelinos parasitados não ovipuzeram, não pudemos recorrer à morfologia dos ovos para fazer o dignóstico preciso das fêmeas, pelo que, só o exemplar de *A. triannulatus* é que poude ser classificado com absoluta certeza. Os demais, que pertencem à série *tarsimaculatus,* apresentam marcação idêntica à dos *A. oswaldoi* que puderam ser diagnosticados pelo exame dos ovos. Estes ovos apresentam morfologia idêntica aos estudados por um de nós (Galvão, 1940) (Fig. 2) e talvez correspondam a variedade *A. oswaldoi metcalfi* Galvão & Lane, 1938. Todavia não podemos afirmar com precisão que se trate desta espécie, pois no total de 123 anofelinos dissecados, 4 apresentaram ovos de *A. strodei* do tipo I estudados por Galvão (1938).

E' sabido que o *A. strodei* não pode, em muitos casos, ser diferenciado do *A. oswaldoi* apenas pelos caracteres das fêmeas. Por tais fatos, determinamos com reserva a segunda espécie parasitada.

Nos mosquitos que dissecamos os flagelados se localizavam apenas no tubo digestivo, principalmente no estômago. No esôfago nunca encontramos tais pa-

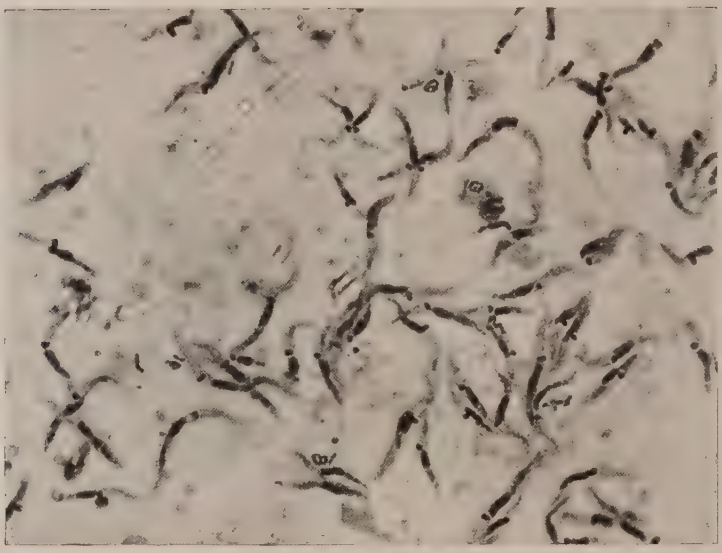


Fig. 4 — Formas predominantemente em critídia de *Herpetomonas pessoai* n. sp. (Serv. Des. Fac. Med. Univ. S. Paulo).

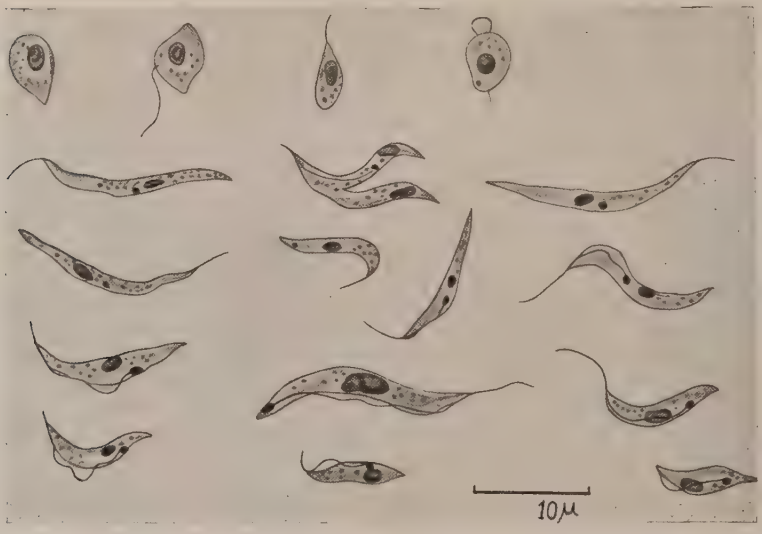


Fig. 5 — Desenho em câmara clara de diversas formas de *Herpetomonas pessoai* n. sp. Copia de um original colorido de D. Lili Ebstein (Serv. Des. Fac. Med. Univ. S. Paulo), feita por A. Pugas.

rasitas. No reto êles eram mais numerosos na sua última porção. Não encontramos parasitas nas glândulas salivares, no hemocele, nos tubos de Malpighi e nos ovários. No exame a fresco, poude ser perfeitamente observado que os flagelados penetravam nos tubos de Malpighi apenas na parte adjacente à sua abertura no tubo digestivo, o que indica se tratar apenas de uma localização transitória de tais flagelados. Tal não acontecia, entretanto, na parede do estômago, onde êstes parasitas se aglomeravam em feixes numerosos sobre ou dentro das células. E' mais provavel que êles estivessem dentro das células epiteliais, como se podia deduzir da disposição em feixes das formas flageladas em torno das células e do seu movimento reduzido e lento, de tipo vermiforme, sem nenhum deslocamento, em contraste com elementos que se locomoviam rapidamente na luz do orgão.

Fazendo preparações em separado das diferentes porções do tubo digestivo, verificamos a existência das seguintes formas (Fig. 5): Na porção anterior do estômago predominam as formas em critídia, muito delgadas, havendo, entretanto numerosas formas em tripanosoma (Fig. 3); mais raros elementos em leptômonas, mais curtos e mais largos, de extremidades afiladas; raríssimas formas pequenas, leismaniformes, em que não se consegue ver flagelo livre. Em todas estas formas ha numerosos grãos de volutina no protoplasma.

Na porção posterior, junto dos tubos de Malpighi, nota-se maior número de formas mais curtas, em leptômonas.

Nas primeiras porções do reto, os parasitas são pouco numerosos; nas últimas porções entretanto, notam-se, ao par de formas em critídia e em leptômonas, numerosas formas pequenas, em que não se pode ver flagelo livre, o que dá um aspeto de verdadeiras leishmanias. Alguns elementos maiores, parecem representar formas de passagem para as em leptômonas, em que um flagelo livre às vêzes é visto.

As formas em tripanosoma medem de 12,10 a 15,73 μ de comprimento, com média de 14 μ, por 1,21 a 2,42 μ de largura. O flagelo livre atinge, no máximo, metade do comprimento do protozoário. O blefaroplasto é grande, mas não tanto como nas formas em critídia e sempre se acha afastado da extremidade posterior, a meio caminho entre esta e o núcleo, e deslocado para um lado, acolado à margem do protoplasma. Núcleo grande, alongado, sub-central ou, na maioria dos casos, posterior, quando os grãos de volutina se distribuem na parte anterior do protoplasma.

As formas em critídia são mais alongadas e delgadas, medindo no mínimo 12,1 μ de comprimento e 21,78 no máximo, com 18 μ em média, por 1,21 μ de largura na maioria dos casos, podendo, entretanto atingir raramente a 3,63 μ. O flagelo livre em geral mede 1/3 do comprimento do protozoário podendo atingir no máximo metade deste comprimento. O blefaroplasto é grande, geralmente oval, tomando quasi toda a largura do corpo do protozoário, em geral acolado à porção anterior do núcleo. Em outros casos ele se desloca para o lado do núcleo. O rizoplasto forma uma membrana ondulante, em geral muito discreta. Núcleo em geral posterior, alongado, tendo atrás de si numerosos grãos de volutina. (Fig. 4).

Não encontramos formas típicas em leptômonas, mas sim elementos muito largos e curtos, parecendo uma grande leishmania, mas com flagelo anterior. Observam-se destas formas em divisão. Entre estas formas atípicas em leptomonas e as formas em leishmania ha várias gradações.

As formas em leishmania, mais encontradas no reto, apresentam um pequeno núcleo posterior e blefaroplasto grande. São redondos ou levemente ovais, com diâmetros indo de 2,4 μ a 4,4 μ. Não pudemos ver espessamento cístico do seu periplasto.

Segundo o conceito de Wenyon (1926) as *Trypanosomidae* parasitas monoxenos de insetos devem ser colocados em 3 gêneros — *Lepto-*

monas, Crithidia, Herpetomonas — a sua transmissão se fazendo por contaminação de fezes contendo formas císticas em Leishmania na fase infectante do seu ciclo evolutivo, que se passaria predominantemente nas últimas porções do intestino.

O gênero *Leptomonas* Kent, 1880 se caracteriza por apresentar somente formas em leptômona e em leishmania. A sua espécie tipo é *L. bütschli* Kent, 1880, parasita do intestino de um nematoide *Trichobius gracilis*. Suas espécies são tambem parasitas de moluscos e insetos.

O gênero *Crithidia* foi creado por Léger (1912) para um flagelado parasita do tubo digestivo do *Anopheles maculipennis,* que foi denominado de *C. fasciculata.* Léger baseou-se nas formas em leishmania para caracterizar o gênero, mas como tais formas tambem são presentes nas espécies do gênero *Leptomonas* e *Herpetomonas,* isto trouxe confusão na sistemática desta família. Por esta razão Patton em 1908 emendou a sua definição, pois o que o caracterizava era, além das formas em leishmania e leptômona, a presença de longas e delgadas formas em critídia, com o seu característico cinetoplasto junto e anterior ao núcleo, de onde se origina um rizoplasto mais ou menos tortuoso, que se desprende em flagelo livre da porção anterior afilada do citoplasma.

Finalmente o gênero *Herpetomonas* foi creado por Kent em 1880 para um flagelado de intestino da *Musca domestica,* denominado por Leidy (1856) de *Bodo muscarum,* que apresenta, além das formas em leishmania, leptômona, e critídia, tambem formas em tripanosoma.

Os tripanosomídeos monoxenos de culicídeos têm sido pouco estudados e a respeito da sua posição sistemática tem havido muita confusão. Thomson e Robertson (1925) fazem uma revisão do assunto, cujos pontos principais citamos abaixo, dando tambem as respectivas indicações bibliográficas no fim deste trabalho.

Ross em 1898 já havia notado a presença de flagelados em várias espécies de *Culex,* principalmente em larvas, pupas e adultos de *C. fatigans* e tambem em anofelinos. Chatterjee (1901) encontrou flagelados semelhantes a tripanosomas em várias espécies de anofelinos. Christophers (1901) verificou o mesmo no intestino e reto em grande número de anofelinos e culicinos. Durham (1902) relata tal encontro em *Aedes (S.) aegypti.* Léger (1902) encontrou no intestino do *Anopheles maculipennis* um flagelado que apresentava formas longas de 8 a 14 μ de comprimento e outras curtas de 3 a 4 μ., com um flagelo do mesmo comprimento que o corpo. Nestas formas longas, o flagelo se origina de um blefaroplasto próximo e anterior ao núcleo e se dirige para a extremidade anterior afilada, de onde emerge sua porção livre. Creou, então, para êstes flagelados, um novo gênero a que denominou de *Crithidia,* (espécie tipo *Crithidia fasciculata*) que teria como característico possuir formas curtas em leishmania. Patton (1908), verificando que êste carater de formas curtas em leishmania, era com-

partilhado pelos flagelados dos gêneros *Leptômonas* e *Herpetômonas,* emendou a definição de Léger do gênero *Crithidia,* que passou a se caracterizar pela presença das formas a que hoje denominamos de critídia, além das outras em leptômona e leishmania.

Lingard e Jennings (1906) encontraram flagelados em larvas de *Culex,* mas, pelas figuras que apresentaram, não se pode dizer se se trata de formas em leptômona ou critídia. Sergent & Sergent (1906) descreveram e figuraram a *Herpetomonas algeriense* encontrada em 11 % de *Culex pipiens* e em um exemplar de *Aedes aegypti,* criados de larva no laboratório. Observaram também em larvas de vários anofelinos e de um *Culex,* formas em leptômona muito longas. Novy, Mc Neal e Torrey (1907) descreveram dois tripanosomídeos parasitando *Culex pipiens, Culex sylvestris* e *Culex triseriatus*: *Trypanosoma (Herpetomonas) culicis* e *Crithidia fasciculata.* Woodcock (1914), porém, verificou que havia confusão, na classificação de tais flagelados, pois o primeiro era realmente uma *Crithidia,* devendo pois ser denominado *Crithidia culicis* (Novy, Mc Neal e Torrey, 1907) e o segundo só continha formas em leptômona, pelo que não era *Crithidia fasciculata* Léger, 1902, mas sim do gênero *Leptomonas,* devendo ser denominada *Leptomonas fasciculata* (Novy, Mc Neal e Torrey, 1907) (*nec* Léger, 1902). Mais tarde *Crithidia fasciculata* Léger, 1902 e *Leptomonas* não especificadas, foram encontradas em vários culicínios pelos seguintes autores: Mezinesco (1908), Wenyon (1908 e 1911), Patton (1912), Franchini (1911 e 1912), Laveran e Franchini (1920), Woodcock (1914) (*Crithidia fasciculata*).

Mais recentemente Thomson e Robertson (1932) receberam de Noguchi 7 amostras de flagelados cultivados e estudados por Noguchi e Tilden (1926), que as classificaram no gênero *Herpetomonas,* isoladas de insetos e plantas. Damos abaixo a lista dêles, apresentada por Thomson e Robertson:

Herpetomonas culicidarum do *Anopheles quadrimaculatus.*
H. culicidarum do *Culex pipiens.*
H. oncopelti de *Lygoeus kalwii.*
H. oncopelti de *Asclepins syriaca.*
H. muscidarum da *Musca domestica.*
H. media de *Calliphora* sp. n.º I.
H. parva de *Calliphora* sp. n.º II.

Tais flagelados, entretanto, foram considerados por Robertson e Thompson no sub-gênero *Strigomonas,* de M. e A. Lwoff, 1931, por possuirem a porção anterior truncada com uma depressão infundibiliforme de onde sai um flagelo, cujo movimento é de rotação e não ondulatório como nas formas flageladas do gênero *Leptomonas* e *Leishmania.* Tal morfologia foi observada por Noguchi e Tilden (1926) nas *H. culicidarum* no intestino da *A. quadrimaculatus.*

A *Herpetomonas algeriense* de SERGENT & SERGENT (1906) apresenta formas com o blefaroplasto posterior ao núcleo, mas a sua largura de 5,5 μ. a diferencia facilmente de *Herpetomonas pessoai.*

SUMMARY

A flagellate was found by the authors in the gut of Anophelines belonging to the subgenus *Nyssorhynchus*. The flagellate proved to be new and was named *Herpetomonas pessoai* n. sp. This happened during dissections made at Vila Queiroz, S. Paulo, a region of high endemicity of cutaneous leishmaniasis. Six of the anophelines dissected were found parasitised by this new flagellate (4.87 %): 1 specimen was determined as *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *triannulatus* var. *davisi* and 5 as *Anopheles* sp. probably *A.* (*Nyssorhynchus*) *oswaldoi*. The second species could not be determined with precision because none of the mosquitoes which showed such flagellates in their guts laid eggs and their ovaries were not developed. Many mosquitoes from the same captures, however, which were not parasitised, laid eggs of the *A. oswaldoi* type. This wise the above diagnosis was possible.

The lack of development of the ovaries and the friability of the stomachs of infected mosquitoes apparently indicated the pathogenic action of *Herpetomonas pessoai*. The site of infection was exclusively the stomach and hind gut. In the anterior part of the stomach there were some trypanosomic forms of this flagellate and in the posterior one crithidial forms predominated. In the hind gut round forms with or without flagellum with the shape and size of a leishmania were predominant. Between these short and round forms and long and thin flagellate bodies of crithidial forms there were all sorts of flagellates which we could not classify easily as leptomonad forms.

BIBLIOGRAFIA

CHARTTERJEE, B. C., 1901, Parasites in Anophelines. *Ind. Med. Gaz*, 36: 371. (*)

CHRISTOPHERS, S. R., 1901, *The Anatomy and Histology of the adult Female Mosquitoes. Reports to The Malaria Committee,* (Fourth series), Royal Society London, p. 15. (*)

DURHAM, H. E., 1902, Reports of The Yellow Fever Expediction to Para (1900). *Thomson Yates Labor. Rep.* 4. 363. (*)

FRANCHINI, G., 1911, Note on Leishmania and Mosquitoes. *Lancet,* 2: 1268-1269. (*)

FRANCHINI, G., 1912, On the presence of Leishmania in the Digestive Tract of *Anopheles maculipennis. Ann. Trop. Med. Parasit.*, 6: 41. (*)

GALVÃO, A. L. AYROZA, 1938, Observações sôbre algumas espécies do sub-gênero *Nyssorhynchus* com especial referência a morfologia dos ovos. *Rev. Biol. Hig.*, S. Paulo, 9 (1): 51-60.

GALVÃO, A. L. AYROZA & LANE, J., 1938, Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo. VI. Revalidação do *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *oswaldoi* Peryassú, 1922 e discussão sobre *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *tarsimaculatus* Goeldi, 1905, *In Livro Jubilar do Prof. Travassos, Rio de Janeiro,* pp. 169-178, ests. 1-2.

LAVERAN, A. & FRANCHINI, G., 1920, Contribution à l'étude des flagellés des Culicides, des Muscides, des Phlebotomes et de la Blatte Orientale. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 13: 138. (*)

LÉGER, L., 1902, Sur un flagellé parasite de l'*Anopheles maculipennis. C. R. Soc. Biol., Paris,* 54: 354-356. (*)

LINGARD, A. & JENNINGS, E., 1906, Some flagellate forms found in the intestinal Tract of Diptera and other genera. London Published by Adlard. (*)

MEZINCESCO, D., 1908, Les Trypanosomes des moustiques et leurs relations avec les *Haemoproteus* des oiseux *C. R. Soc. Biol., Paris,* 64: 975-976. (*)

NOGUCHI, H. & TILDEN, E. B., 1926, Comparative studies of Herpetomonas and Leishmanias I. Cultivation of Herpetomonads from Insects and Plants. *J. Exp. Med.*, 44 (3): 307-325. (*)

NOVY, F. G., MC NEAL, W. J. & TORREY, H. N., 1907, The Trypanosomes of Mosquitoes and other insects. *J. infect. Dis.* 4: 223-276, pls. 7-13. (*)

PATTON, W. S., 1907, Preliminary note on the life cycle of a species of Herpetomonas found in *Culex pipiens. Brit. Med. J.*, 2: 78. (*)

ROSS, R., 1898, Report on a Preliminary Investigation into Malaria in the Sigur Ghat, Octacomund. *Trans. Smith Indian Branch Brit. Med. Assoc.*, 8: 148. (*)

SERGENT, Ed. & SERGENT, Et., 1906, Sur un flagellé nouveau de l'intestin des *Culex* et des *Stegomyia, Herpetomonas algeriensis*. Sur un autre flagellé e sur des spirochétes de l'intestin des larves de Moustiques, *C. R. Soc. Biol., Paris*, 60: 291.

SPEER, A. J., 1927, Compendium of the Parasites of Mosquitoes. *U. S. Public Health Serv., Hyg. Lab. Bull. n. 146*. Washington, D. C.

THOMSON, J. G. & ROBERTSON, A., 1932, The Relationship of Certain Plant and Insect Flagellate to the Sub-genus *Strigomonas* M. & A. Lwoff, *Trans. Roy. Soc. trop. med. Hyg.*, 25 (4): 287-291 (1931).

THOMSON, J. G. & ROBERTSON A., 1925, A Note on the Flagellates of Anophelines and Culicines Previously Mentioned in the Literature with a Description of a Crithidial Form in a New Host *Anopheles umbrosus* from the Federate Malay States. *J. Trop. Med. Hyg.*, 28 (23): 419-424.

WENYON, C. M., 1908, Report of Travelling Pathologist and Protozoologist. Third Report of Wellcome Research Laboratories, Khartoum, p. 121. (*)

WENYON, C. M., 1911, Report of six Months' Work of the Expedition to Bagdad on the subject of Oriental Sore. *J. Trop. Med. Hyg.*, 14: 103-109. (*)

WENYON, C. M., 1926, *Protozoology* William Wood and Company, New York.

WOODCOCK, H. M., 1914, Further remarks on the flagellate parasites of *Culex*. Is there a generic type, *Crithidia? Zool. Anz.*, 44: 26-33. (*)

(*) Indicação bibliográfica dada por Thomson & Robertson (1925).

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 321-324
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

INFLUÊNCIA DA SULFANILAMIDA SOBRE A IMUNIDADE [1]

GENESIO PACHECO e GOBERT ARAUJO COSTA

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

No estudo do mecanismo de ação da sulfanilamida ficou estabelecido por WOLFF & JULIUS (citado em MINGOJA) que êsse agente esterilizante não altera as células orgânicas nas culturas de tecidos, enquanto germens patogênicos são impedidos e destruidos por ela, especialmente *in vivo*. Deixava prever a verificação a possibilidade da sulfanilamida não alterar o mecanismo imunitário, cuja natureza é essencialmente celular.

À vista de sua larga aplicação terapêutica há, pois, particular interesse em apurar si ela é capaz de influir na imunidade, mormente tratando-se de uma substância corante apresentando certos caracteres dos agentes bloqueantes do sistema retículo-endotelial. E como a sulfanilamida é empregada exclusivamente no tratamento de doenças infectuosas, de mistura até com vacinas ou concomitante a estas, compreende-se a importância dessa verificação.

O assunto foi examinado num de seus aspectos por SAVAGNONE, durante a imunização ativa de animais ou no correr de infeção pelo bacilo tífico. Em coelhos submetidos a doses repetidas de suspensões de bacilo tífico injetava êle diariamente sulfanilamida (Prontosil) no correr da imunização, em doses correspondentes às doses terapêuticas. Procedimento análogo teve com doentes de febre tifoide, nos quais administrava diariamente, 3 comprimidos de Prontosil durante 8-10 dias consecutivos. Em ambas as experiências a dosagem do teôr de aglutininas para o bacilo tífico revelou aumento regularmente crescente do título aglutinante nos animais e nos doentes, acompanhando a curva de crescimento dêsse anticorpo e das testemunhas.

KNEELAND & MULLIKEN verificam a formação de anticorpos protetores para infeção pneumocócica em ratos infetados experimentalmente, tratados por sulfapiridina e solfatiazol. Referem observações análogas de WOOD & LONG, e de FINLAND e colaboradores, tendo êstes

[1] Recebido para publicação a 24 de Julho de 1941.
Trabalho do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz.

examinado tambem a presença de aglutininas para pneumococos no sangue de pneumônicos tratados com sulfapiridina. KNEELAND & MULLIKEN prestam particular atenção à produção de precipitinas no sôro, verificadas com polisacarídos de pneumococos, presentes em 16 de 21 dos casos examinados. Na maioria das vêzes coincidia o aparecimento de anticorpos precipitantes com a normalização da temperatura. Estas verificações foram feitas com sulfapiridina e sulfatiasol em comparação, tendo observado que a formação de precipitinas era muito mais regular com o uso do sulfatiasol que com a sulfapiridina (3/4:1/4).

Si bem que essas verificações evidenciassem indiferença da imunização ativa em presença da sulfanilamida, naturalmente levando em conta a natureza do composto sulfanilamídico, nem sempre são essas as condições nos doentes submetidos a tratamento. Muitas vêzes ocorre estar já estabelecida a imunidade quando se tem de intervir com a sulfanilamida, na superveniência de outra infecção. Vamos dizer, um paciente protegido por uma vacina antitífica contrae uma infeção gonocócica, uma criança protegida contra difteria tem uma pielite. Não interfere a sulfanilamida com a imunidade já constituida em individuos nestas condições?

Examinamos a questão com relação às aglutininas ao sangue de animais previamente imunizados experimentalmente.

Tres coelhos recebem doses crescentes da suspensão duma amostra de *Proteus*. Depois de atingir o sôro título aglutinante elevado recebem debaixo da pele doses diárias de 1 cc. de Prontosil soluvel, a 5 %. [2] Passados 16 dias dêsse tratamento dosam-se as aglutininas, cujo teôr permanece inalterado, aumentado de um tubo na testemunha. Depois de um período de descanço de 9 dias repetiu-se novamente a dosagem e houve decréscimo de um tubo de diluição apenas, tanto na testemunha como em um dos animais em prova, pois que o outro animal morrera no intervalo da última prova.

QUADRO I

Coelho n.º	*Título aglutinante inicial*	*Após 16 dias de doses diárias - 1 cc. de "Prontosil"*	*Após 9 dias de descanço*
1 (Test.)	1/2.500	1/5.000	1/2.500
2	1/5.000	1/5.000	1/2.500
3	1/10.000	1/5.000	

[2] A Casa Bayer ofereceu gentilmente o Prontosil empregado nas experiências.

Repetiu-se a experiência com resultado análogo. Um coelho recebe debaixo da pele doses crescentes de suspensão do *Proteus*, iniciada em 5/11/941, repetidas cada tres dias. Ensaiado o título do sôro em 15/11, aglutinava a bactéria injetada a 1/640; repetida em 26/11 aglutinava 1/5.000. Desta data em deante o animal recebe por via venosa, todos os dias 0,5 cc. de "Prontosil" soluvel Bayer, a 5 %, até 27/11, quando fizemos uma larga sangria de 15 cc. e deixamo-lo em descanço.

Retomamos a administração de Prontosil na veia, com dose maior que anteriormente, após o descanço, e observamos franco aumento de aglutininas no sangue:

QUADRO II

DIA	25/11/40	6/12	7/12	9/12	12/2	16/12	25/12	27/12		2/1/41	4/1	6/1
Titulo aglutinante	P1 5.000	P1 ±5.000	P1 ±5.000	P1 5.000	P1 10.000	P1 ±5.000	P1 5.000	Grande sangria 5.000	Descanço	P2 1.200	P2 2.500	5.000

P1 = 0.5 cc. de "Prontosil"; P2 = 1.5 cc. de "Prontosil".

Não sendo o *Proteus* bactéria frequente nas infecções, repetimos as experiências com brucela, mais vêzes ocasionando infecções.

Três coelhos são imunizados com *Brucella abortus*. Quando o sôro aglutina a amostra empregada em título elevado recebe debaixo da pele diariamente 1 cc. de Prontosil soluvel, a 5 %.

QUADRO III

lho n.º	*Peso*	*Titulo aglutinante*		*Peso*	*Titulo aglutinante*		*Peso*	*Titulo aglutinante*		*Peso*	*Titulo aglutinante*
	1,512 gr.	1/2.500	Diariamente 1 cc. de "Prontosil" debaixo da pele durante 3 dias	1,474	1/1.280	Mais 1 cc. de "Prontosil" debaixo da pele durante 7 dias consecutivos	1,334	1/160	Descanço de 14 dias		
	1,462 gr.	1/320		1,432	1/80		1,390	1/40		1,400	1/160
(test.)	1,582 gr.	1/640		1,544	1/640		1,534	1/160		1,600	1/320

Desta vez houve redução do título aglutinante nos animais injetados com sulfanilamida, mantendo a testemunha o título, que caiu no

entanto, após 10 dias, como os injetados. Em todo caso essa redução não chegou à supressão total das aglutininas circulantes.

Parecem evidenciar as observações que sulfanilamida não interfere na imunidade constituida, a-pesar-da queda do título aglutinante observada na última experiência, podendo ser administrada em vacinados sem prejudicar estados imunitários estabelecidos.

LITERATURA

KNEELAND, Y. & MULLIKEN, B., 1940, Antibody formation in cases of lobar pneumonia treated with sulfathiazole. *J. Clin. Invest.*, 19: 735-738.

SAVAGNONE, L., 1939, Sul mecanismo d'azione dei sulfamidi. *La Sett. Med.*, 18: 1457-1462.

MINGOJA, Q., 1938, Compostos sulfanilamidicos. *Arq. Biol., S. Paulo*, 22: 37-53.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 325-327
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

DÉTERMINATION DU COEFFICIENT D'ABSORPTION DES PIGMENTS DANS LES CELLULES [1]

RENÉ WURMSER

(Avec 2 figures)

Le rôle physiologique attribué aux pigments, longtemps limité aux cas de la chlorophylle, des lipochromes végétaux et des pigments sanguins, a pris de l'extension quand on a reconnu le caractère enzymatique de diverses proteines colorées, les flavoproteines par exemple, ou leur couplage avec des systèmes enzymatiques, ce qui est le cas des cytochromes. L'étude des mécanismes auxquels participent ces pigments trouve dans la spectroscopie et la spectrophotométrie une méthode de choix à cause de la grande sensibilité de l'oeil ou des cellules photoélectriques. Il s'en faut cependant que les techniques habituelles répondent à tous les besoins, car elles ne permettent pas la détermination quantitative des spectres d'absorption dans des milieux non homogènes. L'erreur due à la diffusion peut même rendre toute mesure illusoire quand on a affaire à un pigment se trouvant à une faible concentration dans les cellules.

Parce que dans les recherches sur la photosynthèse il est desirable de connaître avec une bonne précision le pouvoir absorbant des chloroplastes, j'avais, il y a une quinzaine d'années (Journal de Physique, 1926, T. 7. p. 33), montré comment on peut obtenir cette determination dans le cas des tissus très minces comme ceux d'une Ulve en comparant l'échantillon normal avec un échantillon décoloré. La présente note concerne l'emploi de la méthode dans le cas général où l'on ne dispose pas de cette ressource. Le principe de la mesure des coefficients d'absorption et de diffusion est le suivant. Considérons une couche d'épaisseur 1 (fig. 1). Un faisceau lumineux d'intensité I_0 frappe la surface inférieure. Il subit dans la couche un affaiblissement du d'une part à l'ab-

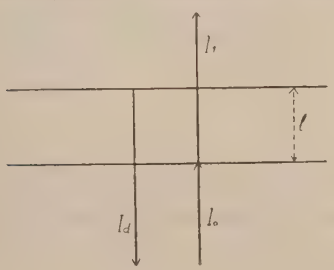


Fig. 1

[1] Reçu le 29 Juillet 1941.

sorption, d'autre part à la diffusion qui renvoie vers la source une partie I_d du rayonnement. Designons par k le coefficient d'absorption et par k' le coefficient de diffusion. En négligeant les pertes par réflexion sur les deux faces et en admettant que la lame est assez mince pour qu'il n'y ait pas lieu de tenir compte de la diffusion latérale, la relation de LANGEVIN donne pour le rapport $\frac{I_o}{I_1}$ de l'intensité incidente à l'intensité transmise la valeur:

$$\frac{I_o}{I_1} = \mathrm{Ch}\, l\sqrt{k\,(k+k')} + \frac{2k+k'}{2k\,(k+k')}\,\mathrm{Sh}\, l\sqrt{k\,(k+k')}$$

Si nous faisons deux mesures de $\frac{I_o}{I_1}$, l'une $\left(\frac{I_o}{I}\right)_1$ avec une couche d'épaisseur l_1, l'autre $\left(\frac{I_o}{I_1}\right)_2$ avec une couche d'épaisseur l_2, nous pouvons obtenir les valeurs de k et de k'. Soit N_1, N_2, respectivement les logarithmes des rapports $\left(\frac{I_o}{I_1}\right)_1$ et $\left(\frac{I_o}{I_1}\right)_2$. En portant la différence $(N_2 - N_1)$ en fonction de N_1, on a, pour un milieu absorbant sans diffusion $(k' = 0)$ une droite dont la pente est egale à $\frac{l_1}{l_2 - l_1}$. Pour un milieu diffusant sans absorption $(k = 0)$, la difference $(N_2 - N_1)$ croit plus lentement en fonction de N_1 que dans le cas précédent et tend vers la valeur $\log \frac{l_2}{l_1}$.

Lorsque le milieu présente à la fois de l'absorption et de la diffusion les valeurs de $(N_2 - N_1)$ se placent sur des courbes comprises entre la courbe $(k = 0)$ et la droite $(k' = 0)$, se rapprochant d'autant plus de cette dernière que l'absorption est plus forte.

Il est facile d'établir un nomograme tel que celui représenté dans la figure 2, correspondant aux valeurs de l_1 et l_2 choisies.

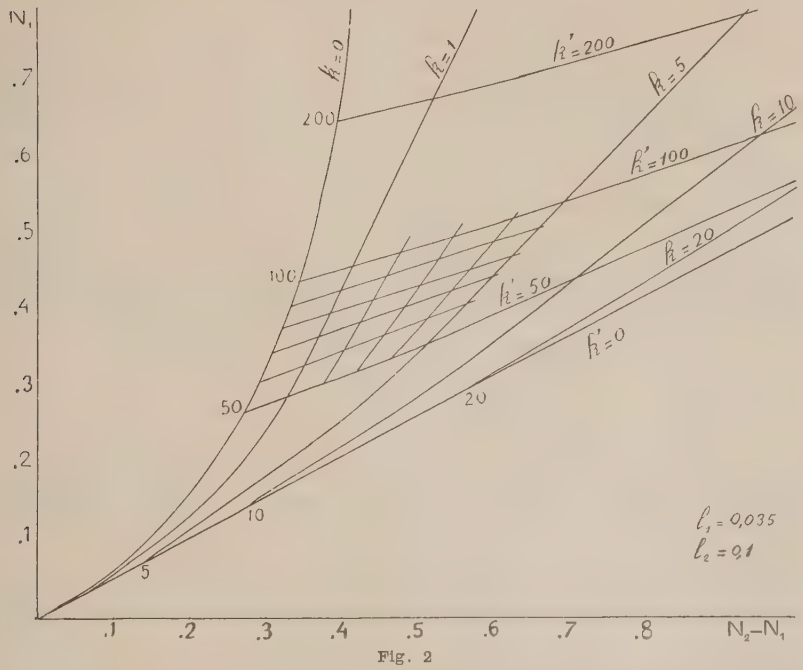


Fig. 2

On peut donc, par ce procédé, tracer le spectre d'absorption quantitatif d'un pigment contenu dans une suspension de cellules dont on fait varier l'épaisseur, ou dans des coupes de tissu. La méthode s'applique en particulier au dosage de ces pigments *in vivo*. Elle permet aussi la comparaison de leur absorption à l'état où ils se trouvent dans les cellules et à l'etat libre.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 329-335
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

UM NOVO "TEST" PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PRINCÍPIO ANTIANÊMICO DO FÍGADO [1]

GILBERTO G. VILLELA e MARIA ISABEL MELLO
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 4 figuras no texto)

O estudo de um "test" biológico para a avaliação do princípio antianêmico do fígado (fração G de COHN) tem sido objeto de numerosas investigações.

Os animais tornados anêmicos por meio de hemorragias repetidas fornecem resultados contraditórios porque o tipo da anemia é muito diverso do da anemia perniciosa do homem. A anemia produzida por tóxicos foi tambem empregada por vários autores (JASTROWITZ & NEIDHARDT, RUSZNIAK & ENGEL, GOTTSEGEN, VEDDER, etc.). Segundo ADLERSBERG & GOTTSEGEN a anemia produzida experimentalmente no coelho por meio de intoxicação com a fenilhidrazina (0,01 gr. por quilo de peso) não é influenciada pelo extrato hepático. VEDDER igualmente não conseguiu modificar a anemia da fenilhidrazina pela injeção do fígado antianêmico.

Da mesma forma a anemia do coelho por hemorragia não se altera no que respeita ao número de hemátias.

Mc GOWAN empregou como "test" o frango Leghorn infestado pela tenia *Davainea proglottina*. Os animais apresentam uma anemia que é melhorada pelo uso de extratos hepáticos ativos. A percentagem de infestação é porém de 65 % e depende de condições dificilmente padronizaveis. Mais interessantes são os ensaios feitos em animais submetidos a dietas deficientes. Assim, VAUGHAN, MULLER & ZETZEL obtiveram no pombo, alimentado exclusivamente com milho, uma anemia do tipo pernicioso e capaz de se modificar pela ministração do extrato hepático. Os pombos após 10 dias e com uma reticulocitose inferior a 12 % são injetados com o extrato por via venosa e os reticulocitos contados diariamente. A resposta positiva se obtem após 1 semana. Os extratos inativos, as vitaminas B_1 e B_2 não produzem reticulocitose. WILLS achou, no entanto, que as flutuações da reticulocitose do pombo são

[1] Recebido para publicação a 29 de Julho de 1941.

muito grandes para que se possa utilizar este animal como "test". Além do mais PEABODY & NEALE não encontraram proporcionalidade entre a dose e a resposta da reticulocitose. Outros autores HEIMAN, CONNERY & GOLDWATER) não conseguiram obter alteração da reticulocitose mesmo com a injeção de extratos hepáticos ativos.

DUESBERG propoz um "test" pelo qual os extratos hepáticos transformam "in vitro" a hemoglobina em metahemoglobina. DEUTSCH e mais tarde WILKINSON & DEUTSCH não conseguiram obter uma relação entre a ação antianêmica e a formação de metahemoglobina. A anemia do rato alimentado com leite de cabra (ROMINGER & BOMSKOV) é curavel pelo extrato hepático e portanto capaz de servir como "test". O porco de 3 semanas de idade quando submetido a uma dieta carencial está sujeito a uma anemia tambem curavel pelo fígado (WINTROBE e colab.).

CRANDALL, FINNE & SMITH conseguiram recentemente produzir uma anemia macrocítica e hipercrômica em cães operados com fístula biliar e que é curavel pelo extrato hepático. Este fato é bastante interessante e mostra uma deficiência provavel na absorção do fator antianêmico devido a uma perturbação na circulação biliar ocasionada pela fístula.

JACOBSON em 1934, verificou que o cobaio normal é capaz de apresentar aumento da reticulocitose quando se injetam extratos hepáticos ativos. Mais tarde o mesmo autor aplicou êste método para o ensaio biológico do fator antianêmico. A reticulocitose do cobaio é baixa (de 0 a 5 por mil) e o aumento para 20 por mil já exprime uma resposta positiva. Numerosos autores não conseguiram obter resultados quantitativos pelo "test" de JACOBSON (GOODMAN, GEIGER & KLUMPP, RODRIGUES-OLLEROS & R-MOLINA, AGREN & CASPERSSON). Entretanto, outros como MILLER & RHOADS, LANDSBERG & THOMPSON obtiveram resultados satisfatórios.

A resposta se dá entre o 7.º e o 12.º dia. A dose de 5 mgr. de fígado fresco por dia (5 cc. do extrato Lilly n.º 343) mostra-se ativa. BARRIE recomenda que o "test" seja feito em condições padronizadas, mas mesmo assim o "test" não é específico.

A eosinofilia intensa que se produz pela injeção de extrato hepático em indivíduos normais e em doentes de anemia perniciosa (WATKINS & BERGLUND, MEULENGRACHT & HOLM, ALLIN & MEYER) nos sugeriu a possibilidade de utilizar como "test" a ação dos extratos sobre a eosinofilia de animais normais.

Procuramos primeiramente verificar quais os valores normais para a eosinofilia nos cobaios mantidos no laboratório e submetidos a uma dieta uniforme. As taxas encontradas mostraram-se constantes para um mesmo animal durante período longo (3 meses). Existem animais em que a eosinofilia é sempre elevada (7 a 10 %) e outros em que a taxa é de 1 a 3 %. Escolhemos somente os animais de eosinofilia baixa para os ensaios, bem que os outros tambem respondam positivamente à ministração do fator antianêmico.

Os extratos antianêmicos por nós empregados foram os de Lilly n.º 343 e Lilly concentrado que são padronizados em doentes de anemia perniciosa [2]. A quantidade de extrato injetada foi de 0,5 cc. a 1 cc. (igual a 1 e 2 U. antianêmicas) em dose única ou repetida no máximo 3 vezes. As contagens fizeram-se diariamente, tendo sido tambem feita concomitantemente a prova de JACOBSON. O sangue foi retirado da orelha, por um pequeno corte de tesoura e as lâminas coradas pelas soluções de Leishman e de Giemsa. Contaram-se 400 a 500 leucocitos para cada lâmina. Algumas vêzes, para melhor confirmação, as contagens foram repetidas.

No gráfico da fig. 1 veem-se as respostas à injeção parenteral de 1 e 2 unidades antianêmicas em doses únicas e duplas.

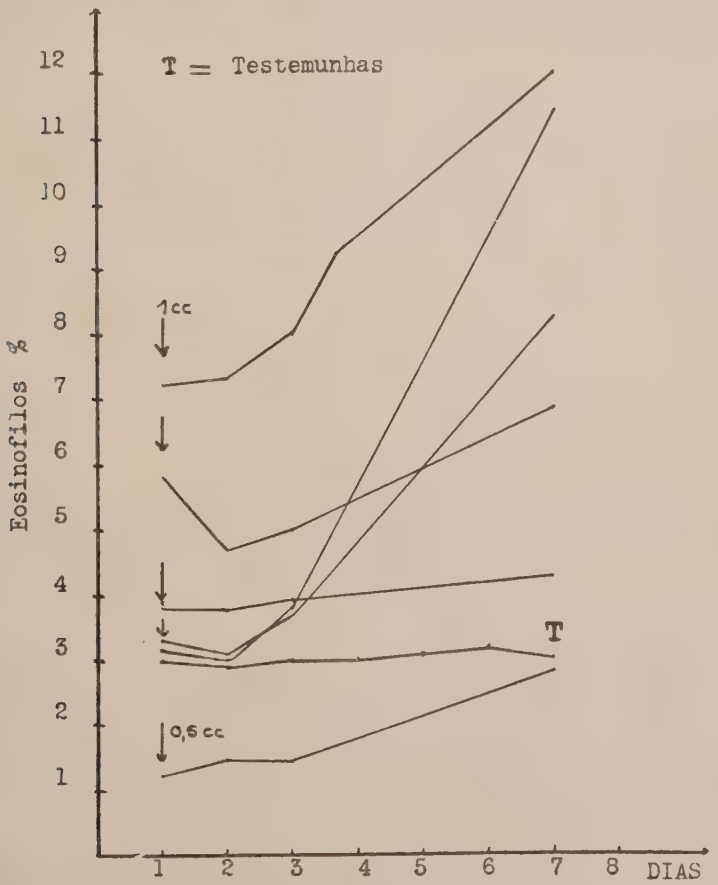


Fig. 1 — Ação de 1 e 2 unidades antianêmicas sobre a eosinofilia do cobaio normal.

[2] Agradecemos ao representante da firma Eli Lilly & C.º, Sr. Eduardo Baptista, pela remessa dos extratos Lilly que serviram para este trabalho.

As respostas pela reticulocitose foram nítidas com doses elevadas do extrato. Em doses pequenas a elevação reticulocitária é muito fugaz e inconstante.

Os mesmos animais voltaram a apresentar eosinofilia normal cerca de 8 a 10 dias depois da ministração do extrato, tornando possivel repetir o "test". Esse fato já havia sido notado por MEULENGRACHT & HOLM e por ALLIN & MEYER em pessoas normais ou em doentes de anemia perniciosa submetidos ao tratamento antianêmico.

Outros ensaios praticados com extratos injetaveis (Abbott, Evans), igualmente ativos em doentes, nos forneceram respostas positivas no cobaio do 6.º ao 8.º dia depois da injeção. Resultados negativos foram verificados com extratos de mucosa gástrica e de baço. Nestes casos verifica-se frequentemente até uma baixa da taxa de eosinófilos.

A fig. 2 sumariza êsses resultados.

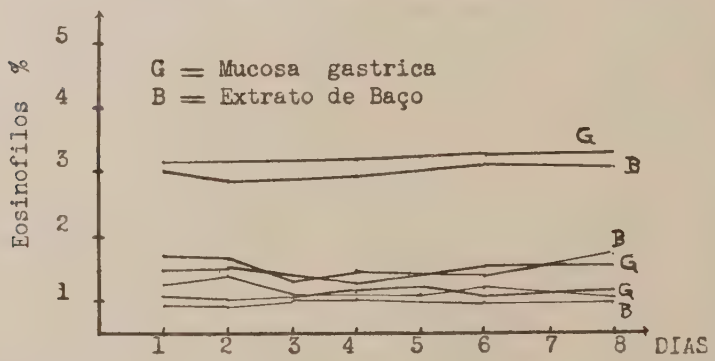


Fig. 2 — Ação dos extratos esplênicos e de mucosa gástrica sobre a eosinofilia do cobaio normal.

Com o fim de saber se a eosinofilia era resultante de algum estímulo produzido pelo fator antianêmico ou de substâncias outras existentes no extrato hepático, praticamos o ensaio no extrato inativo. Para isso foram preparadas por adsorção duas soluções partindo do extrato Lilly ativo. O extrato depois de acidificado para o pH 5 foi adicionado de carvão adsorvente (norita) agitado durante 1 hora e por fim filtrado em funil Buchner. O filtrado foi tambem tratado pela norita da mesma forma. Os filtrados reunidos representam a parte inativa. A parte adsorvida pelo carvão foi eluida pelo alcool a 5 % a quente. Esta solução corresponde à parte ativa do extrato (fração antianêmica G). Os ensaios comparativos com ambas as frações mostraram claramente que a parte inativa não alterou a eosinofilia ao passo que a fração ativa estimulou enormemente a produção de eosinófilos (fig. 3).

A percentagem de nitrogênio foi determinada e indicou 14 mgr. % para a fração ativa e 18,7 mgr. % para a fração inativa. Como se pode apreciar, as substâncias nitrogenadas (amino ácidos, substâncias húmicas, etc.) não foram capazes de influir sobre a eosinofilia bem que o teôr em nitrogênio fosse mesmo mais elevado na fração inativa.

A adição de tiamina e de ácido ascórbico aos extratos hepáticos comerciais sendo hoje de prática corrente, induziu-nos a pesquisar a ação dessas vitaminas sobre a eosinofilia do cobaio.

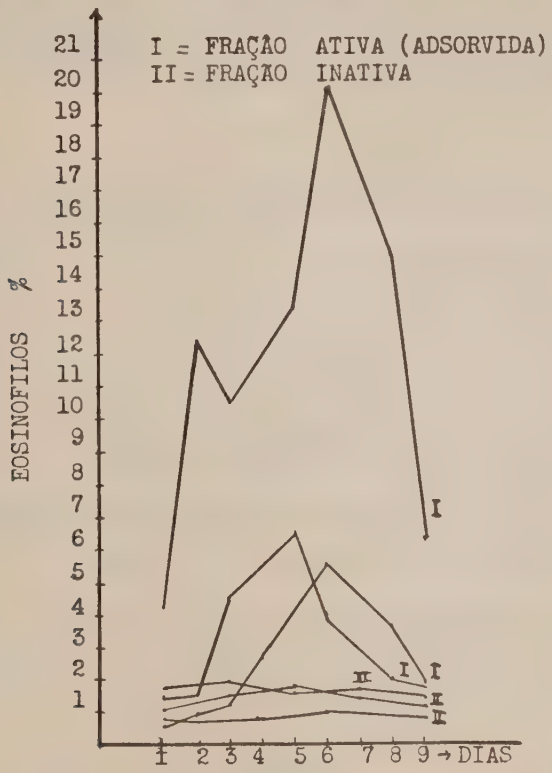


Fig. 3 — Ação comparada das frações ativas e inativas do extrato hepático.

As vitaminas empregadas para esses ensaios foram soluções contendo 100 mgr. de ácido ascórbico e 10 mgr. de cloridrato de tiamina. Em ambas as séries a eosinofilia foi seguida durante 12 a 15 dias, não se tendo notado nenhum aumento na taxa de eosinófilos como se deduz da inspeção da fig. 4. Em alguns casos aparece no dia imediato à injeção de ácido ascórbico uma queda de eosinofilia.

O estudo da ação do extrato hepático antianêmico sobre a eosinofilia, por nós apresentado nesta nota, revela a possibilidade em utilizar este processo na avaliação da atividade desses extratos. Bem que ainda a sensibilidade não tenha sido estabelecida para permitir uma dosagem quantitativa precisa, é entretanto mais um meio que o laboratório pode lançar mão para o controle dos extratos antianêmicos.

Para a execução do "test" torna-se indispensavel selecionar os animais sensiveis, tendo-se previamente verificado num período de 6 dias, diariamente, a cifra dos eosinófilos. Os animais muito jovens

(peso inferior a 200 grs.) ou muito idosos (peso superior a 400 grs.) devem ser rejeitados. A alimentação deve ser uniforme e controlada. As retiradas de sangue devem ser feitas em jejum pela manhã para evitar qualquer oscilação na percentagem de eosinófilos produzida pelo período digestivo. Os animais, depois de selecionados, devem ser submetidos aos ensaios e só aqueles que apresentarem elevação sensivel da eosinofilia é que podem ser utilizados.

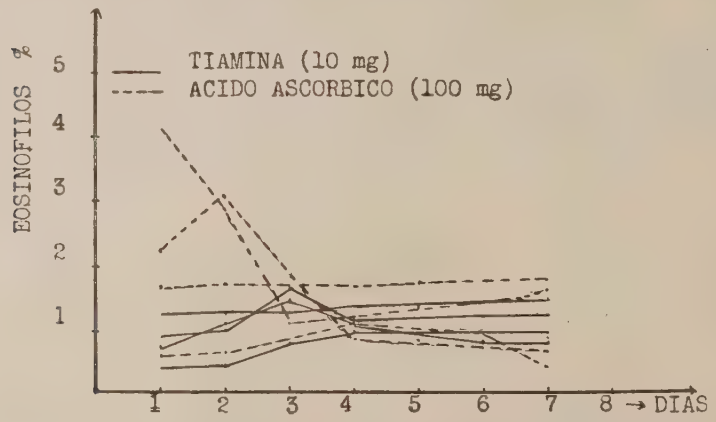


Fig. 4 — Ação do ácido áscorbico (100 mgr. em 1 e 2 injeções) e da tiamina (10 mgr. dose única ou fracionada) sobre a eosinofilia do cobaio normal.

O "test" da eosinofilia sendo mais rápido do que o de Jacobson pela reticulocitose é menos trabalhoso e a sensibilidade nos pareceu maior, porque já pode ser apreciado com a dose de 1 u.a., bem que êsse ponto seja ainda objeto de investigação posteriores.

ABSTRACT

New Assay Method for the Approximative Determination ot the Liver Extract Potency

The development of eosinophilia following liver therapy as observed in normal and pernicious anemia cases by Whitby, Meulengracht & Holm and more recently by Allin & Meyer, was studied and an assay method in guinea pigs was worked out. The AA. suggest that the increase in eosinophilia of guinea pigs after the injection of liver extracts is able to be employed as a biologic test.

It was observed that normal guinea pigs weighing from 200 to 400 gr. and submitted to a fixed diet shows a marked eosinophilia when injected with 0,5 cc. to 1 cc. of an active extract (Lilly N-343, Abbott, Evans). The augmentation of the number of eosinophilic cells in blood appears 4 to 7 days after the parenteral administration, returning thereafter to the starting value (fig. 1).

Stomach and spleen extracts are inactives (Fig. 2). Ascorbic acid (100 mg.) and thiamine chloride (10 mg) are also devoid of activity and frequently produces a negative response (Fig. 4).

The active extract (Lilly) being adsorbed in acid medium with charcoal (norite) and eluated with warm 40 % ethanol showed when injected a very marked eosinophilic action. Nitrogen determinations in both fractions revealed 14 mg and 18,7 mg of N per cent. Therefore, the antianemic principle which was adsorbed in norite and not other nitrogen compounds seems to be the active substance which induces an eosinophilic response.

The AA. claims that their new assay method is useful as a laboratory practical test although a quantitative exact response was not yet been obtained.

BIBLIOGRAFIA

ADLERSBERG, D. & GOTTSEGEN, G., 1929, Wirkung der Leberstrakte im Tierversuch *Arch. Exp. Path. Pharmak.*, 142: 323.

ALLIN, R. N. & MEYER, O. O., 1940, The development of eosinophilia following liver therapy. *J. Lab. Clin. Med.*, 26: 457-463.

BACHRACH, W. H. & FOGELSON, S. J., 1937, The effect of antipernicious anemia substances upon guinea pig reticulocytosis and a review of the litterature. *J. Lab. Clin. Med.*, 22:925.

CRANDALL, L. A., FINNE, O. & SMITH, P. W., 1941, Experimental antipernicious anemia factor deficiency in dogs. *Science*, 93: 549-550.

JACOBSON, B., 1935, The response of the guinea pig's reticulocytes to substances effective in pernicious anemia. *J. Clin. Invest.*, 14: 665.

MC GOWAN, J. P., 1932, The quantitative determination of the potency of liver extract *Arch. Int. Med.*, 49: 26.

MEULENGRACHT, E. & HOLM, S., 1930, Eosinophilia in Liver diet. *Am. J Med. Sc.*, 179: 199.

PEABODY, W. A. & NEALE, R. C., 1933, Pigeon as a hematopoietic test animal. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 22: 1.231.

VAUGHAN, J., MULLER, G. & ZETZEL, L., 1930, The response of the grain-fed pigeons to substances effectives in pernicious anemia. *Brit. J. Exp. Path.*, 11: 456.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 337-342
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

CONSIDERAÇÕES SOBRE ALGUNS REDUVIIDEOS DA SUBFAMILIA "STENOPODINAE" [1]

A. DA COSTA LIMA

Escola Nacional de Agronomia, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 7 figuras no texto)

Recebendo do Prof. SALVADOR MAZZA especimens de um Stenopodíneo para determinação, vi-me obrigado a examinar os vários representantes da subfamília guardados na coleção entomológica do Instituto Oswaldo Cruz.

Dentre êles, encontrei 2 exemplares de uma espécie extremamente próxima da que BARBER, em sua valiosa contribuição (1930), descreveu com o nome de *Kodormus bruneosus*, tipo do gênero *Kodormus*, por êle creado na mesma ocasião.

Comparando-os com exemplares do inseto que PINTO (1927) descreveu com o nome *Otiodactylus signatus*, notei as seguintes principais diferenças:

Kodormus n. sp.	*Otiodactylus signatus* (fig. 1)
Processo postocular sob a forma de conspícuo tubérculo apresentando 2 ou 3 saliências setíferas distais e 1 ou 2 posteriores.	Processo postocular largo, digitiforme, não pedunculado, apresentando 4 saliências setíferas distais e 1 posterior.
Olhos com cerdas esquamiformes, semelhantes às que se inserem nos tubérculos ou grânulos do corpo.	Olhos nús.
Região gular com 4 tubérculos setíferos, 2 aproximadamente na linha tangenciando o limite anterior do olho e 2 na que tangencia a borda posterior, perfeitamente visíveis.	Região gular com tais tubérculos na mesma posição, porém, quasi invisíveis.
Angulos anteriores e posteriores do pronotum espinhosos; lobo anterior do pronotum com 2 espinhos discais; bordos laterais, principalmente no lobo anterior, crenulados, isto é, providos de tubérculos setíferos.	Angulos anteriores e posteriores do pronotum agudos, porém, não espinhosos; pronotum sem espinhos ou tubérculos setíferos.
Scutellum provido de espinho cônico, ereto; postscutellum tambem com saliência tuberculiforme.	Scutellum com o ápice em ponta romba, sem espinho dorsal; postscutellum invisivel.
Trocânteres e fêmures anteriores com espinhos relativamente robustos; fêmures com tubérculos setíferos, principalmente na parte dorsal.	Trocânteres e fêmures anteriores com espinhos relativamente pequenos; fêmures sem tubérculos setíferos.

[1] Recebido para publicação a 30 de Julho de 1941.

Com tais diferenças, poder-se-ia manter *Kodormus* distinto de *Otiodactylus*, não prevalecendo, portanto, a opinião que expendi na nota 51 inclusa à pag. 166 do 2.º volume de "Insetos do Brasil", que transcrevo nas linhas seguintes:

> "*Kodormus* Barber, 1930, é seguramente idêntico a *Otiodactylus* Pinto, 1927, e a respectiva espécie tipo, *K. bruneosus* Barber, 1930, do Panamá, parece ser tambem idêntica a *O. signatus* Pinto."

Todavia, se agora, com exemplares com todos os caracteres de *Kodormus*, posso afirmar que *K. bruneosus* é bem diferente de *O. signatus*, posso tambem dizer que os mesmos devem pertencer ao gênero *Ocrioëssa* Bergroth, 1918.

De fato, procurando comparar os caracteres que eles apresentam com os que se lêm na descrição original de *Ocrioëssa*, verifiquei concordância absoluta de quasi todos, inclusive a *ausência da fosseta esponjosa nas tíbias anteriores*, o que me leva a suspeitar que a espécie considerada por Barber idêntica a *O. lobuliventris*, provida de tal estrutura, seja diferente da que Bergroth descreveu e na qual se vêm: "tibiae anticae (saltem in mare) leviter curvatae apice fossa spongiosa destitutae."

Na chave de Barber, o gênero *Ocrioëssa* acha-se incluido na divisão "Head behind eyes unarmed or provided with simples setigeous spines", bem longe, portanto, de *Kodormus*, que foi colocado na 1.ª divisão ("head ventral — laterally behind eyes armed with ramose or forked spines.").

Comparando-se as diagnoses originais de *Ocrioëssa* e *Kodormus*, verifica-se que a principal diferença entre os 2 gêneros reside no aspecto dos processos postoculares: em *Ocrioëssa* "pone hos (oculos) spinis paucis (in typo tribus) setulam gerentibus armatis"; e, em *Kodormus*, "with ramose spines or processes".

Assim, segundo a chave de Barber e baseando-nos na descrição de Bergroth, *Ocrioëssa* deve ser incluido na 1.ª divisão, e não na 2.ª como fez Barber.

Bergroth, referindo-se à região postocular, descreveu-a armada de 3 espinhos cerdosos e mais adiante, assinalando os tubérculos da região gular diz: "gula... atque et post oculos tuberculos binis parvis setam gerentibus praedita."

E' evidente, pois, que Bergroth, mencionando o caracter pequeno destes tubérculos, distingui-os perfeitamente dos processos cerdosos da região postocular, por ele considerada *espinhos* e não tubérculos.

Consequentemente, não tenho a mínima dúvida em classificar os nossos exemplares no gênero *Ocrioëssa*, acreditando que o mesmo se verifique com *Kodormus bruneosus*.

Como não parece que os mesmos sejam idênticos, nem a *lobuliventris*, nem a *bruneosus*, e uma vez que não podem ser identificados com 2 espécies de *Ocrioëssa* descritas por Barber, pois ambas apresentam fossa esponjosa nas tíbias anteriores, considero-as pertencentes

a uma nova espécie — *Ocrioëssa Barberi*, assim nomeada em homenagem ao presado colega norteamericano, pela sua valiosa contribuição ao estudo destes insetos.

Ocrioëssa Barberi n. sp.

(Figs. 2, 5 e 6)

Corpo revestido de pequenas cerdas esquamiformes, recurvadas, ora emergindo de saliências granuliformes, ora de tubérculos mais ou menos conspicuos. Côr geral parda, distintamente mais escura, ou mesmo enegrecida, nos fêmures anteriores (exceto o quinto distal), no ápice das tíbias anteriores, nos prolon-

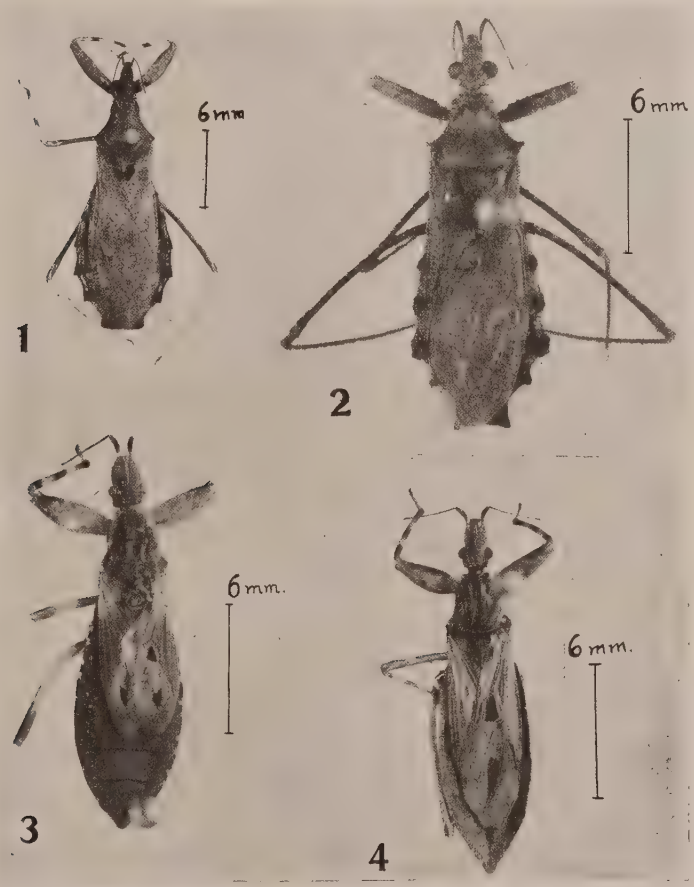
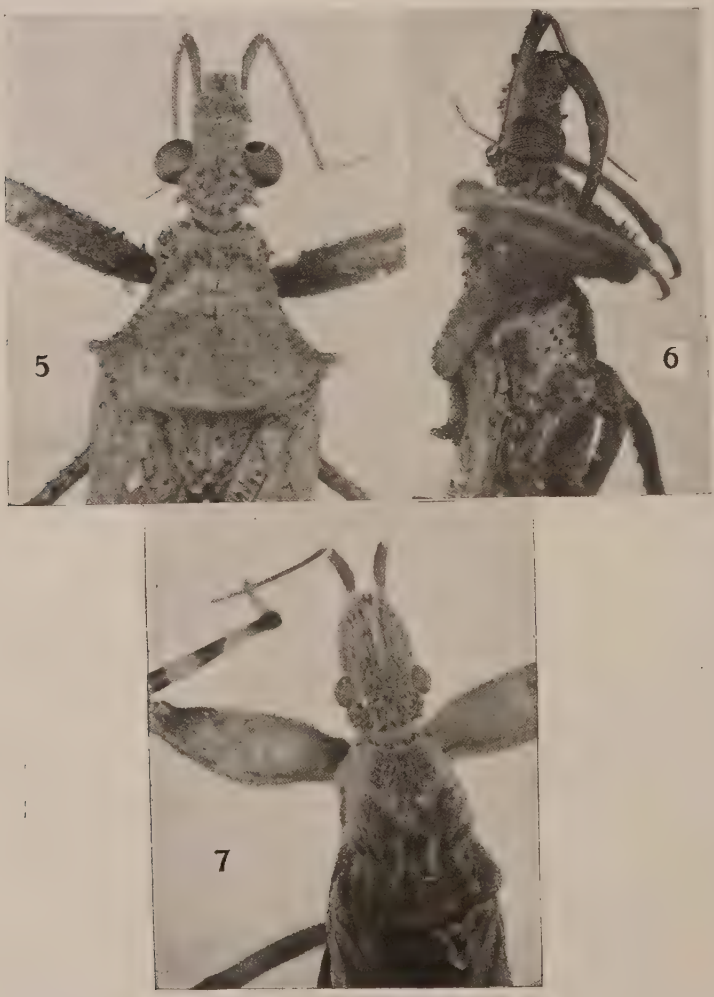


Fig. 1 — *Otiodactylus signatus* Pinto, 1927. (De Costa Lima, 1940, fig. 365); Itatiaia (700m.) (E. do Rio) — J. F. Zikán col. Fig. 2 — *Ocrioëssa Barberi*, n. sp.; ♂ holotipo; Jussaral (Angra dos Reis) (E. do Rio), 8.IV.1935, Travassos e Almeida col.; n.º 4.522, da coleção do Instituto Oswaldo Cruz. Fig. 3 — *Oncocephalus Mazzai* n. sp.; Santiago del Estero (Rep. Argentina), S. Mazza col.; n.º 4.523, da coleção do Instituto Oswaldo Cruz (n.º 51.658 de Mazza). Fig. 4 — *Oncocephalus antipodus* Reuter, 1882; Guaratiba (D. Federal), 6.XI.1933 da coleção do Gabinete de Entomologia da Escola Nacional de Agronomia.

gamentos foliáceos do connexivum e em muitos dos tubérculos setíferos, especialmente nos que se encontram esparsos no pronotum, nos fêmures anteriores e nas pernas médias e posteriores; mais clara, ocracea, em quasi todo o 2.º segmento antenal, no quinto apical do femur anterior, nas tíbias anteriores, em tubérculos setíferos pro, meso e metapleurais, nos ângulos anteriores do pronotum e na parte apical dos espinhos dos ângulos posteriores do pronotum, do espinho escutelar e do metaescutelar. Clavus, de côr parda uniforme, sem mácula negra — Comprimento 18 a 19 mm.

Jugae sob a forma de 2 processos espiniformes voltados para diante e um pouco para cima, não atingindo o meio do 1.º segmento antenal; atrás das an-



Figs. 5 e 6 — *Ocrioëssa Barberi*, parte do corpo do exemplar da fig. 2, de cima e de perfil, com maior aumento. Fig. 7 — *Oncocephalus Mazzai* n. sp., parte do corpo do exemplar da fig. 3, vista com maior aumento.

tenas um tubérculo com saliências setíferas; ocelos grandes, elevados e separados por profundo sulco, numa distância aproximadamente igual a que separa cada um dêles da borda do olho; ápice das genas não acuminado; parte postocular da cabeça, de cada lado, com um processo cerdoso, como se vê na figura 5; região gular apresentando 4 tubérculos setíferos (fig. 6), 2 na linha imaginária tangenciando o limite anterior do olho e 2 na que tangencia o limite posterior; 1.º segmente rostral atingindo o limite anterior do olho; 2.º aproximadamente do comprimento do 1.º ou um pouco menor; 3.º pouco mais longo que a metade do 2.º.

Espinhos discais do pronotum um pouco menos desenvolvidos que os que se elevam dos ângulos posteriores; espinho escutelar aproximadamente tão desenvolvido quanto êstes; espinho postescutelar, tuberculiforme, de ponta amarelada; espinhos prosternais aproximadamente tão compridos quanto as jugae, porém mais finos.

Célula pentagonal com nervura transversa distal distinta ou invisivel.

Abdômen com os ângulos posteriores de cada segmento providos de lobo triangular reflexo, mais ou menos desenvolvido, como se pode vêr na figura 2.

Quadris anteriores com tubérculos setíferos, porém sem espinhos.

Trocânteres anteriores e fêmures com espinhos, mais ou menos robustos; aqueles com 4 na parte anterior, o maior na parte distal, e estes, na parte inferior, com 6 até o meio (sendo um dos proximais mais robusto) e 2 no terço apical. Além destes espinhos inferiores, ha ainda 3 na face anterior perto da base e, na parte superior, grandes tubérculos setíferos formando 2 carreiras, tão desenvolvidos ou mesmo mais desenvolvidos que os espinhos da parte inferior.

Tibias anteriores sem fossa esponjosa.

Holotipo: 1 ♂ apanhado em Jussaral, Angra dos Reis (E. do Rio), 8-IV-1935, por Travassos e Almeida, na coleção do Instituto Oswaldo Cruz, n.º 4522 (figs. 2, 5 e 6).

Paratipo: 1 ♂ apanhado no Alto da Serra (S. Paulo), XI-1924, por R. Spitz, da coleção de Parasitologia da Faculdade de Medicina de S. Paulo.

Comparada com a espécie descrita por Bergroth, a nossa se distingue por pequenas diferenças de côr, principalmente por não ter a faixa negra no corium e, sobretudo, pelo aspecto das antenas, que têm o 1.º artículo do tamanho da parte ante-ocular da cabeça, portanto mais curto que em *lobuliventris* ("articulo primo antennarum capite paullo breviore"), e o 3.º e 4.º um pouco mais longos que o 1.º (e não mais curtos).

Kodormus bruneosus deve ser, como disse, uma espécie extremamente próxima da que é representada pelos nossos exemplares. Barber, descrevendo-a, assinala, em cada lado da parte postocular da cabeça, "two rather long setigerous ramose spines or processes, placed one above the other" — o que não se vê nos nossos exemplares.

E' possivel, entretanto, que a comparação do material típico da espécie de Barber e da que aqui descrevo como nova com o holotipo de *Ocrioëssa lobuliventris*, venha mostrar que se tratam de formas de uma mesma espécie.

Passo agora a considerar o Stenopodíneo que me foi mandado pelo Prof. Mazza.

São 2 fêmeas de um *Oncocephalus* Klug, 1830, que me parece tambem uma nova espécie. Um desses exemplares acha-se represen-

tado na figura 3. O outro (n.º 51718 de Mazza) é idêntico ao primeiro e, como aquele, foi apanhado em Santiago del Estero (Rep. Argentina).

Na figura 4 dou a fotografia de um *Oncocephalus* que me parece ser o *O. antipodus* Reuter, 1882, apanhado por Aristoteles Silva em Guaratiba (D. Federal), 6-XI-1933 e guardado na coleção do Gabinete da Escola Nacional de Agronomia. Na mesma coleção ha mais 2 fêmeas da mesma espécie que apanhei em Pinheiro (E. do Rio) (n.º 355 e 356); na coleção do Instituto Oswaldo Cruz ha 2 ♂♂ da mesma espécie apanhados em S. Paulo.

Comparando-se os 2 especimens argentinos com os que me parecem de *O. antipodus*, verifica-se que, se realmente se tratam de formas próximas, apresentam, entretanto, as diferenças abaixo referidas — que me parecem específicas — assim justificando a creação de uma nova espécie.

Oncocephalus Mazzai n. sp.

(Figs. 3 e 7)

Caracteres de *O. antipodus* Reuter, 1882.

Parte anteocular relativamente mais curta e mais larga. Forma do pronotum um tanto diferente; tubérculos laterais do lobo anterior um pouco mais salientes; hemelitros mais curtos.

Conexivo não saliente; máculas pálidas na borda lateral dos segmentos, uma sobre os ângulos laterais e outra pouco atrás do meio do segmento, mais distintas; fêmures distintamente enfuscados na parte apical.

Holotipo: 1 ♀ n.º 51658 (Santiago del Estero) — S. Mazza coll. et leg., com o n.º 4523 na coleção do Instituto Oswaldo Cruz (fig. 3).

Paratipo: 1 ♀ n.º 51718 (Santiago del Estero) — S. Mazza coll. et leg., com o n.º 4524 na coleção do Instituto Oswaldo Cruz.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 343-344
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

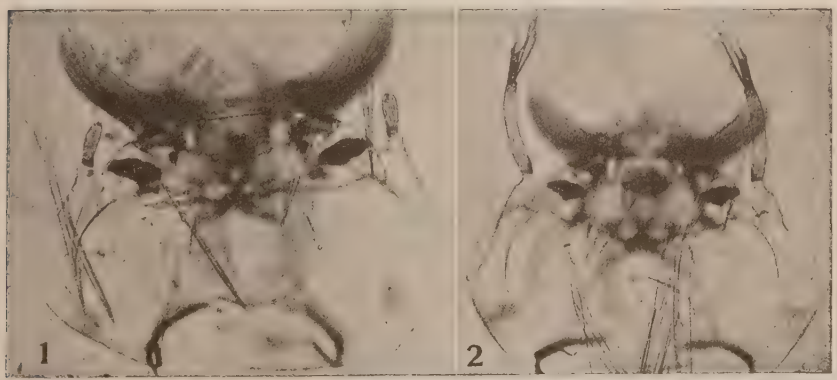
SOBRE UMA CURIOSA ANOMALIA EM UMA LARVA DE "CULEX (C.) NIGRIPALPUS" THEOBALD, 1901 (Diptera, Culicidae) [1]

S. J. DE OLIVEIRA

Escola Nacional de Veterinaria, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 4 figuras no texto)

O *Culex* (*Culex*) *nigripalpus* Theobald, 1901, é uma espécie bastante comum no Rio de Janeiro, D. F., pois frequentemente encontramos suas larvas em focos constituidos por tijelinhas de barro, quasi sempre associadas com as de *Limatus durhami* Theobald, 1901; essas tijelinhas são um ótimo foco para estas duas espécies de mosquitos, pois ficam cheias de detritos orgânicos, principalmente vegetais, o que constitue um bom alimento para as larvas.



Culex (*C.*) *nigripalpus* Theobald, 1901 — Fig. 1: Fotografia da cabeça da larva anomala; fig. 2: fotografia da cabeça da larva normal. Rubem Silva, fot.

Observando ao microscópio larvas nos 3.º e 4.º estádios de *Culex* (*C.*) *nigripalpus* colecionados no Grajaú por Lopes & Oliveira em 22-IX-940, verifiquei que uma das larvas no 4.º estádio não possuia an-

[1] Recebido para publicação a 30 de Julho de 1941.
Trabalho do Laboratório de Parasitologia da Escola Nacional de Veterinária.

tenas e, no entretanto, estava tão vivaz quanto as larvas normais. No primeiro momento pensei que as antenas do *Culex* (*C.*) *nigripalpus* tinham sido comidas por alguma larva de *Limatus durhami,* o que não seria de estranhar, pois por diversas vezes tenho observado os hábitos predadores deste sabetíneo e as duas espécies tinham sido colecionadas no mesmo fóco; no entretanto, verifiquei, com um aumento maior, que a larva possuia rudimentos de antenas perfeitamente simétricos, donde pude concluir estar em presença não de um traumatismo, mas sim duma anomalia.

Culex (*C.*) *nigripalpus* Theobald, 1901 — Fig. 3: Antena anomala; fig. 4: antena normal. Desenhos originais.

A larva foi isolada, passando à pupa em 7-X-940 e a adulto em 10-X-940; tanto a pupa como o adulto (uma fêmea) não apresentaram nenhuma anomalia.

A antena anomala (figs. 1 e 3) apresenta-se reduzida de cerca de um quarto do seu tamanho normal e com uma forma ovoide, não apresentando como a normal (figs. 2 e 4) o tufo antenal e os espinhos apicais.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 345-354
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

ESTUDO DA AÇÃO INHIBIDORA DO SUCO DE "SOLANUM LYCOPERSICUM" SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO DE PLANTAS [1]

A. OZORIO DE ALMEIDA, MARIO D. GOULART, MAURICIO IELPO e A. VIEIRA PINTO

Seção de Cancerologia, Fundação Gaffrée-Guinle, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 3 figuras no texto)

A germinação das sementes e o desenvolvimento das plantas requerem condições determinadas dos elementos que constituem o meio exterior, sejam condições de humidade, de temperatura, de pressão de oxigênio e iluminação. Além dêsse conjunto de elementos recentemente descobriu-se que a germinação e o crescimento são condicionados por agentes químicos que, nas diferentes literaturas, são designados equivalentemente por "Wuchsstoffe" = "growth substance" = "substances de croissance" = fito hormônios, e que KOGL caracteriza como sendo, 1.º) substâncias estimulantes; 2.º) produzidas no próprio organismo; 3.º) tendo ação bio-catalítica. Esse grupo compreende substâncias que estimulam o alongamento das células e substâncias que aumentam a matéria seca de cada célula. Divide-se em dois grupos fundamentais: 1.º) grupo auxina (auxina *a*, auxina *b*, ácido indolilacético, etc.); 2.º) grupo bios (aneurina, biotina, estrona, etc.).

A característica fundamental dos fito-hormônios é provocar, produzir e acelerar o crescimento das sementes e das plantas, sendo gerados pelas próprias plantas; dêsse modo, a diminuição de seu teôr ou o seu desaparecimento suprime ou retarda o crescimento.

Dêsse modo, vemos que, si podemos acelerar o crescimento pela ação dos fito-hormônios, podemos tambem, reduzir a sua velocidade pela ação de agentes físicos, ou químicos que destruam os fito-hormônios e reduzam seu teôr nas plantas. Êsses dados nos permitem definir e bem delimitar os objetivos do presente trabalho. Em primeiro lugar, dêste afastamos as "substâncias de crescimento" para só considerarmos o estudo de ações que tenham o efeito de retardar ou suprimir a germinação por uma ação direta e imediata, e não por uma ação indireta, destruindo os fito-hormônios ou suspendendo-lhes a atividade.

[1] Recebido para publicação a 31 de Julho de 1941.

Se a literatura sobre os fito-hormônios é extremamente grande, ao contrário, as publicações sobre as ações inhibidoras da germinação e do crescimento das plantas são muito escassas, recentes e de dificil acesso, o que explica que, só depois de muito adeantadas as nossas experiências, tenhamos tido dela conhecimento.

A idéia que o desenvolvimento dos vegetais dê lugar a substâncias que retardam seu próprio desenvolvimento é relativamente antiga e, sob várias formas, ocorreu a vários autores para explicar a fadiga da terra após repetidas colheitas de um mesmo vegetal: assim, "autovenenos" (Selbsgifter) de JAEGER, "autotoxina" de MERKENSCHLAGER, "Ermüdungsstoffe" de REINITZER, seriam substâncias geradas nos vegetais, que se difundiriam até a terra de cultura e inhibiriam o desenvolvimento dêsses vegetais. WIESNER, em 1894, refere-se a "substâncias inhibidoras" da germinação e do crescimento ao verificar que sementes de *Lepidium, Linum* e *Trifolium* não germinavam sobre a mucilagem das sementes de *Viscum album*.

Deixando de lado alguns trabalhos de carater utilitário referentes à mais rápida germinação de sementes lavadas do que daquelas impregnadas das substâncias do fruto, chegamos a MOLLISCH que, diante da observação de que a maioria das sementes não germina nos frutos e sim quando dêles afastadas e colocadas na terra ou sobre papel de filtro, estabeleceu com clareza o problema a resolver, do seguinte modo: Porque não germinam as sementes (ou esporos) nos frutos (nos receptáculos) das plantas?

O estudo dêsse problema foi por OPPENHEIMER empreendido e em 1922 publicados os seus trabalhos. Suas experiências foram feitas principalmente com as seguintes espécies: *Marchantia polymorpha, Marchantia paleacea, Lunularia cruciata, Funaria hygrometrica, Solanum lycopersicum, Lagenaria vulgaris, Cucumis sativa, Phytolacea dioica, Phraseolus vulgaris, Lupinus luteus, Nicotiana rustica, Capsicum anuum, Papaver somniferum*.

A solução que OPPENHEIMER dá ao problema de MOLLISCH é que a não germinação das sementes nos seus receptáculos naturais depende, em certas espécies, da ausência de humidade, por vêzes de oxigênio, mas que em outros vegetais existe uma ação inhibidora dos sucos do fruto ou das paredes do receptáculo sobre as sementes.

A partir das experiências de OPPENHEIMER vários autores retomam o mesmo problema e chegam à mesma conclusão de que, em certos vegetais, existem, na verdade, substâncias inhibidoras da germinação e do crescimento; estas substâncias existem na parte carnosa dos frutos, como tambem nas sementes e nas membranas que as envolvem.

TÉCNICAS DE ESTUDO EMPREGADAS

As técnicas empregadas pelos diferentes autores, a partir de WIESNER, se podem agrupar do seguinte modo:

1.º) Deixar as sementes "in situ" e abrir fendas em seus receptáculos e invólucros naturais, de modo a facilitar o acesso do oxigênio às

sementes e então humedecer, regando com agua as sementes deixadas nessas condições.

2.º) Semear as sementes sobre fatias do fruto; por exemplo, sementes de tomate sobre fatias de tomate, etc.

3.º) Semear sobre terra, algodão, ou papel de filtro colocados em um cristalizador de vidro; depois então regar as sementes com o líquido a estudar, seja o suco dos frutos carnosos ou o líquido de maceração das sementes ou dos seus receptáculos e invólucros, quer empregando êsses líquidos em natureza, quer após diluições ou tratamentos vários.

4.º) Semeaduras repetidas sobre o mesmo meio de modo a acumular nêste as substâncias inhibidoras que por difusão passam para êle e impedem ou retardam a germinação e crescimento da nova semeadura.

Qualquer que seja a técnica empregada, os resultados observados se distribuem nas seguintes classes:

1.º) Nenhuma germinação; testemunhas com germinação normal.

2.º) Porcentagem de germinação inferior à das testemunhas.

3.º) Porcentagem final de germinação igual à das testemunhas, mas obtida em maior tempo, donde diminuição de velocidade de germinação e crescimento.

4.º) Medida do comprimento das plantas ou do tamanho das raizes.

Os critérios adotados são pois, de porcentagem de germinação, velocidade de crescimento, grandeza final do desenvolvimento.

RESULTADOS OBTIDOS

As principais experiências de Oppenheimer foram feitas sobre as sementes de *Solanum lycopersicum,* com os seguintes resultados:

O suco do tomate empregado puro retarda de muitos dias a germinação; em diluições crescentes até 1/32 esse efeito se faz notar cada vez menos. O aquecimento do suco até 100º pouco diminue a sua ação inhibidora. O precipitado obtido do suco tratado pelo alcool separado e redissolvido tem tambem um efeito inhibidor.

Reinhart, tambem com as sementes de *Solanum lycopersicum*, empregou o suco do mesmo fruto em concentração natural ou em diluições progressivas; medindo depois o comprimento das raizes das plantas ou o desenvolvimento ao cabo de um tempo fixo, a saber, uma semana. Seus resultados são os mesmos de Oppenheimer: o suco puro ou diluido a 1/2 não permite a germinação; em maiores diluições a germinação se faz e as raizes são tanto mais longas quanto menores as concentrações do suco empregado.

A cocção do suco e sua neutralização não diminuem sua atividade. O extrato aquoso das sementes tem tambem ação inhibidora tão ou mais intensa que a do suco do fruto.

Schuck constatou que as sementes de alface difundem no meio em que germinam uma substância que reduz a porcentagem da germinação das sementes colocadas no mesmo meio. A agua de maceração de sementes de alface reduz de 80 a 10 % a germinação de sementes que foram regadas com essa agua.

Köckmann experimentou suco de maçã, pera, marmelo e tomate sobre sementes de *Lipidium* tomando como critério o comprimento das raizes das plantas. Em todos os sucos observou uma ação moderadora sobre a germinação, atribuindo-a a uma substância que denominou "Blastocholin", a qual seria um ácido soluvel na agua e no eter, insoluvel no eter de petróleo, termoestavel, facilmente oxidavel. A "Blastocholin" não é idêntica ao ácido maleico como pensou Copisarow, nem é derivada dêsse ácido (Köckmann).

Ruge usou a técnica de semear sementes sobre papel de filtro ou algodão já impregnados por semeaduras anteriores; poude ele constatar ações inhibidoras da velocidade de crescimento, ações não específicas, pois que as substâncias inhibidoras do *Helianthus anuus* moderam o crescimento das sementes de *Avena sativa*.

PARTE EXPERIMENTAL

Técnica — As sementes sobre as quais se vai experimentar são colocadas em papel de filtro ou em algodão, dispostas em cristalizadores deixados ao ar livre.

Cada dia ou repetidas vêzes no decurso da experiência, molha-se cada cristalizador com o líquido que lhe compete, regando-se assim as sementes, de modo a mantê-las húmidas. Desse modo, em cada série um cristalizador que serve de testemunha é molhado com a agua da canalização da cidade e outro ou outros com os líquidos em experiência. No decurso de todas as nossas experiências executamos essa repetição diária ou apenas muito frequente da rega das sementes, de modo a manter uma ação permanente do líquido em ensaio, ao contrário de todos os autores que nos precederam, cujas técnicas não permitiam tal prolongamento de ação.

Os resultados observados consistem em comparar o número de sementes germinadas em cada experiência com o observado nas testemunhas, o crescimento ulterior das sementes germinadas e tambem o aspecto das plantas resultantes.

1.ª Experiência — Ação inhibidora do suco de tomate puro sobre a semente de tomate.

Sementes de tomate em número de 62 sobre algodão embebido em suco de tomate; testemunhas em número de 80 sementes, humedecidas com agua.

21 dias depois { 62 sementes de tomate + suco de tomate: nenhuma germinação (0 %)
80 sementes de tomate + agua: 75 germinadas (94 %)

2ª Experiência — Ação do suco de tomate puro em várias concentrações sobre sementes de girasol. (Fig. 1).

Fig. 1 — Sementes de girasol regadas com suco puro de tomate e com diluições de 1/10, 1/100 e 1/1000 em confronto com testemunhas regadas com agua.

Cada cristalizador contem 50 sementes. Duração da experiência 15 dias.

Caldo puro:	Germinação ausente.
Caldo diluido a 1/10:	Nasceram todas, porém se desenvolveram mal. Formas monstruosas.
Caldo diluido a 1/100:	Desenvolvimento normal de todas as sementes.
Caldo diluido a 1/1000:	" " " " " "
Testemunha:	" " " " " "

3.ª Experiência — Ação inhibidora do suco de tomate puro e tambem diluido a 1/5 sobre as sementes de *Daucus carota, Brassica oleracea viridis, Lactuca sativa, Brassica oleracea capitata, Cichorium endivia.*

A cada semente correspondem 3 cristalizadores a saber: testemunha, um com caldo puro, um com caldo diluido a 1/5.

100 sementes por cristalizador. Duração da observação 36 dias.

Caldo puro: nenhuma semente germinou em nenhum cristalizador.

Caldo a 1/5: raras sementes germinadas com plántulas monstruosas.

Testemunha: germinação normal.

As sementes regadas com caldo puro, foram lavadas ao cabo de 36 dias e postas a germinar novamente: nenhuma nasceu.

4.ª Experiência — Ação inhibidora do suco de mamão e de abóbora sobre sementes de girasol.

Cada suco foi empregado sem diluição em 50 sementes de girasol; nenhuma germinação se observou, quer com o suco de abóbora, quer com o de mamão.

5.ª Experiência — Ação inhibidora do caldo de tomate filtrado em papel de filtro sobre as sementes de girasol.

Obtem-se desse modo um líquido claro, ligeiramente citrino, fortemente ácido. De 50 sementes de girasol regadas com o caldo filtrado, durante 15 dias: nenhuma germinou.

6.ª Experiência — Ação inhibidora do caldo de tomate tratado pelo carvão vegetal e filtrado após em papel de filtro, sobre as sementes de tomate.

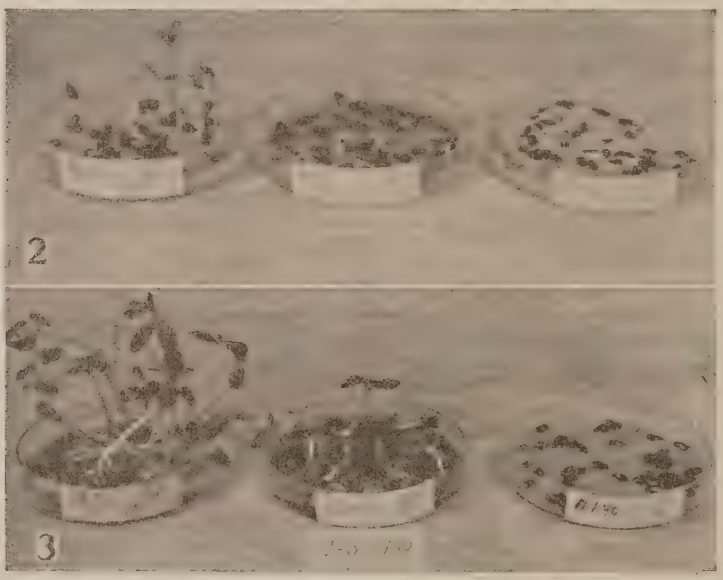
O caldo de tomate é primeiramente filtrado; depois misturado com carvão vegetal finamente pulverizado, agitado durante uma hora e depois novamente filtrado.

Ao cabo de 12 dias, observa-se que, de 100 sementes de tomate regadas diariamente com o caldo tratado: nenhuma nasceu. De 100 sementes de tomate testemunhas: todas brotaram.

No 12.º dia, lavam-se em agua corrente as 100 sementes tratadas pelo caldo e que não haviam nascido e plantam-se: 13 dias depois germinaram 15 que se desenvolvem bem.

7.ª Experiência — Ação inhibidora total do filtrado de suco de tomate, tratado pelo alcool, e ação duvidosa (ou muito pequena) do precipitado alcoólico sobre as sementes de girasol.

Trata-se 60 cc. de caldo de tomate com 120 cc. de álcool absoluto, o que produz um precipitado; agita-se fortemente e depois filtra-se sobre papel de filtro. Lava-se o filtro e o precipitado com mais 60 cc. de álcool absoluto e este junta-se ao filtrado anterior. Os líquidos alcoólicos de filtração são evaporados em temperatura baixa. O precipitado é redissolvido em 60 cc. de agua, constituindo o chamado "líquido P"; o resíduo da evaporação dos filtrados é redissolvido tambem em 60 cc. de agua ("liquido O"); as testemunhas designadas pela letra M. para identificação fotográfica. (Fig. 2).



Figs. 2 e 3 — Explicação no texto. 6.ª experiência. Observe-se as formas monstruosas no cristalizador do meio. Fig. 2, 6 dias depois de plantadas; fig. 3, 15 dias depois.

Em cada cristalizador colocou-se 50 sementes de girasol. Após 14 dias:

50 sementes regadas com soluto do resíduo de evaporação do filtrado alcoólico (O): nenhuma germinada.
50 sementes regadas com soluto do precipitado alcoólico (P): 24 nasceram; formas monstruosas.
50 sementes testemunhas (M): 33 nasceram.

8.ª Experiência — Ação dos extratos alcoólico e etéreo do suco de tomate sobre sementes de tomate.

100 cc. de suco de tomate são evaporados em banho-maria e o resíduo dividido em duas metades; uma destas é exgotada pelo álcool absoluto e a outra

pelo eter. Depois, são o álcool e o eter postos a evaporar e os resíduos são retomados pela agua de modo a reconstituir os volumes primitivos do caldo.

100 sementes de tomate regadas com extrato alcoólico: — 3 % nasceram.
100 sementes de tomate regadas com extrato etéreo: — 80 % nasceram.
100 sementes de tomate regadas com agua: — (Testemunhas) 100 % nasceram.

9.ª Experiência — Ação do extrato clorofórmico de caldo de tomate sobre as sementes de tomate.

Como na 8.ª experiência extraem-se pelo clorofórmio o resíduo seco da evaporação do suco de tomate, evapora-se o clorofórmio e retoma-se o resíduo do clorofórmio por agua, restabelecendo-se o volume primitivo do caldo de tomate.

100 sementes regadas com o líquido do extrato de clorofórmio;
100 sementes são testemunhas: nenhuma diferença nos dois grupos de sementes.

10.ª Experiência — Ação do caldo de tomate neutralizado sobre sementes de girasol.

A neutralização pelo carbonato de sódio do caldo de tomate não modifica sua ação inhibidora sobre as sementes de girasol. De 38 sementes de girasol regadas, nenhuma havia nascido ao cabo de 12 dias. Então as sementes são lavadas em agua e postas a germinar, sendo daí em diante regadas com agua: nasceram 14 sementes ou 36 %.

11.ª Experiência — Ação do ácido fosfórico, ácido tartárico, amônia e carbonato de sódio sobre as sementes de girasol.

Com essas 4 substâncias prepararam-se soluções que ao papel de tornesol eram fracamente ácidas ou alcalinas e com elas irrigaram-se diariamente 4 cristalizadores contendo cada um 50 sementes de girasol.

Rega com sol. de ácido fosfórico: Nasceram todas as sementes. Desenvolveram-se formas monstruosas.
Rega com ácido tartárico: Nasceram todas as sementes e desenvolveram-se normalmente.
Rega com sol. de amônia: Raras germinaram, dando formas monstruosas.
Rega com sol. de carbonato de cálcio: Raras germinaram, dando formas monstruosas.

DISCUSSÃO

Nas experiências relatadas neste trabalho as sementes nos cristalizadores foram sempre repetidas vêzes regadas com o líquido em experiência, de modo a manter permanentemente a ação inhibidora, em estudo, durante toda a duração da experiência; essa técnica distingue-se, pois, de todas as usadas pelos autores que nos antecederam e leva a resultados diferentes, a saber: em nossas experiências as sementes não germinaram, qualquer que seja o tempo que se as deixe em contato com o caldo puro. Nas experiências de outros autores as sementes, uma vez postas em contato com o caldo do fruto, levam mais tempo a germinar, mas, embora mais tardiamente, germinam afinal e se desenvolvem, dando plantas normais; esse fato mostra que o prin-

cípio inhibidor da germinação se destrói com o tempo, quando exposto ao ar, pois que, quando renovada a rega com o caldo puro a germinação não se faz. Trata-se, pois, de um exgotamento da substância inhibidora e não da ação inhibidora.

Nas experiências de outros autores, quando se dilue o caldo empregado, atenua-se o retardamento da germinação. Em nossas experiências inicia-se a germinação de algumas sementes e em tanto maior número quanto mais diluido o caldo; mas, além dêsse fato, observa-se um fenômeno extremamente curioso que consiste no crescimento desharmônico das plantas; as raizes são atrofiadas, os caules engrossados, curtos, recurvados as mais das vêzes não se mantêm eretos, as folhas são mais raras, todo o conjunto torna dificil reconhecer a espécie da planta em estudo.

A ação inhibidora existe, pois, de modo desigual para as diferentes partes da planta, o que conduz a formas monstruosas.

Quando, ao cabo de alguns dias, interrompe-se a experiência, lavando-se as sementes em agua corrente e replantando-as, observa-se a sua germinação, mas sempre em porcentagem menor do que a das testemunhas e tanto menor quanto mais tempo se prolongou o contato com o caldo puro do fruto, até que, para um contato assaz prolongado, (36 dias), nenhuma semente germina.

A ação suspensora da germinação é inócua quando se exerce por tempo não muito longo, mas torna-se mortal se prolongada; entretanto, podemos lembrar que, prolongado, por igual ou mesmo muito mais longo tempo, o contato do caldo do fruto com as sementes não as destrói quando se dá dentro do fruto fechado. Assim resumindo:

No fruto: caldo + semente: não há germinação, nem esterilização das sementes.

Fora do fruto: caldo + semente: não há germinação e há esterilização ou morte das sementes.

Finalmente, as nossas experiências, além de confirmarem a ação inhibidora do caldo, revelam um novo aspeto do problema não menos curioso, a saber: O caldo do fruto inhibidor da germinação é tóxico para as sementes fora do fruto, em contato prolongado.

Essa diferença pode-se dar porque, como se sabe, não ha praticamente oxigênio em contato com as sementes nos frutos carnosos e dêsse modo, as sementes são inhibidas em seu desenvolvimento não só porque não dispõem de oxigênio, como tambem porque estão em contato com uma substância inhibidora. Em contato com o oxigênio as substâncias inhibidoras não permitem a germinação, mas não impedem ações oxidativas que com o tempo destroem a semente. Nessa hipótese, a não germinação das sementes é consequência da falta de oxigênio e não da ação do caldo da fruta. A este caberia então inhibir e impedir o desenvolvimento de seres que no meio nutritivo, que é o caldo do fruto, acabariam por destruir a este e levariam o oxigênio atmosférico até as sementes. Este modo de ver parece-nos o que melhor concilia os diferentes elementos do problema em estudo.

As experiências relatadas neste trabalho foram feitas para esclarecer irregularidades da germinação de sementes irradiadas, no decurso de estudos sobre a natureza da ação dos raios X, feitas na Fundação Gaffrée-Guinle, graças à generosidade do Dr. Guilherme Guinle.

RESUMO

Entre outros dados, o presente trabalho apresenta os seguintes:

O caldo de fruto de *Solanum lycopersicum, Cucumis comunis* e *Carica papaya* impedem a germinação de sementes.

O caldo de frutos de *Solanum lycopersicum* impede a germinação das sementes de *Solanum lycopersicum, Helianthus annuus, Lactuca sativa, Daucus carota, Brassica oleracea viridis, Brassica oleracea capitata, Cichorium endivia.*

A ação inhibidora da germinação existe no extrato alcoólico do suco do fruto de *Solanum lycopersicum,* mas não existe no extrato etéreo ou clorofórmico.

A ação inhibidora observada é total quando se emprega o caldo de fruto do *Solanum lycopersicum* puro, diminui no caldo diluido e desaparece com maiores diluições.

Quando o caldo é suficientemente diluido para permitir apenas a germinação, geram-se formas monstruosas de plantas, com formas anômalas das raizes, caules e folhas.

As sementes não germinadas pela ação do suco de tomate passam a germinar quando lavadas em agua e transportadas para meio normal.

A germinação é então tanto menor quanto mais tempo prolonga-se a ação do caldo do fruto, até que nenhuma semente mais germina.

O caldo de fruto destroi ao ar a capacidade germinativa das sementes, e não a destroi quando estas estão no fruto.

Como as sementes no fruto não estão em contato com o oxigênio, admitiu-se que a ação tóxica do caldo do fruto ao ar é consequência de uma ação de oxidação prolongada pelo oxigênio do ar sobre as sementes, cuja germinação fica impedida pelo caldo do fruto.

Levantou-se a hipótese que a ação das substâncias inhibidoras no fruto destina-se a impedir a proliferação de germens e parasitas que possam atacar as sementes.

SUMMARY

Among several data, the present paper deals with the following:

The juice of the fruit of *Solanum lycopersicum, Cucumis communis* and *Carica papaya* inhibit the germination of seeds.

The juice of fruits of *Solanum lycopersicum* has an inhibiting effect on *Solanum lycopersicum, Helianthus annuus, Lactuca sativa, Daucus carota, Brassica oleracea viridis, Brassica oleracea capitata, Cichorium endivia.*

The growth-inhibiting effect exists in the alcoolic extract of the juice of *Solanum lycopersicum,* but does not exist in the ethereal or chloroformic extract.

When the juice of fruits of *Solanum lycopersicum* is employed pure the growth-inhibiting action is complete, but is lessened in dilute juice and vanishes in greatest dilutions.

When the juice is diluted enough to permit only the germination, monster forms are produced, with anomalous shapes of roots, stems and leaves.

No germinated seeds due to the action of the tomato juice, do germinate when washed in water and placed in normal medium.

The great is the time of the action of the juice, the little is the rate of grown seeds, until not one seed germinate.

The juice of the fruit destroys, in the air, the growth-power of seeds. but fails to have the same effect when the seeds are kept within the fruits.

There has been admitted that the killing action of the juice of fruits at the open air, since the seeds within the fruit are not in contact with oxygen, is the consequence of an action of oxydation by the oxygen of the air on the seeds, whose germination is inhibited by the juice of the fruits.

The hypothesis has been raised, that the action of the growth-inhibiting substances in fruits has the scope of impeaching the proliferation of microbes and parasites, in order of not permiting them to attack the seeds.

BIBLIOGRAFIA

COPISAROW, M., 1935, A new method of fruit and vegetable preservation. The metabolism of apples. *J. Industry and Chemistry*, p. 54 (Cit. em Köckmann, 1936).

JÄGER, G., 1895, Über Ermüdungstoffe der Pflanzen. *Ber. dtsch. bot. Ges.*, 13: 70-72.

KÖCKMANN, A., 1934, Über eine keimungshemmende Substanz in fleischigen Früchten. *Ber. dtsch. bot. Ges.*, 52: 523.

KÖCKMANN, A., 1936, Zur Frage der keimungshemmenden Substanzen in fleischigen Früchten. *Beiheft. bot. Zbl.*, 55 A: 191.

KÖGL, F., 1938, *In Études et Recherches sur les Phytohormones*. Société des Nations.

MERKENSCHLÄGER, F., 1924, Keimungsphysiologische Probleme. *Naturwiss. u. Landwirtsch.* Freising-Munchen.

MOLLISCH, Cit. em OPPENHEIMER, H., 1922, Keimungshemmende Substanze in der Frucht von Solanum lycopersicum und in anderen Pflanzen. *S. B. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturw. kl.*, 131: 59.

MOLLISCH, Cit. em OPPENHEIMER, H., 1922, Das Unterbleiben der Keimung in den Behältern der Mutterpflanze. *S. B. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturw. Kl.*, 131, 279.

REINHARD, A. W., 1933, Zur Frage der Samenkeimung bei Solanum lycopersicum. *Planta*, 20: 792.

REINITZER, Fr., 1893, Über Ermüdungsstoffe der Pflanze. *Ber. dtch. bot. Ges.*, 11: 532-537.

RUGE, U., 1939, Zur Physiologie der genuinen keimungshemmenden und keimungsbeschleunigenden Stoffe von Helianthus annuus. *Z. Bot.*, 33: 529.

SHUCK, A. L., 1935, Growth-inhibiting substance in Lettuce seeds. *Science*, 81: 236.

WIESNER, J , 1894, Pflanzenphysiologische Mitteilungen aus Buitenzorg. IV. Vergleichende physiologische Studien über die Keimung europäischer und tropischer Arten von Viscum und Loranthus. *S. B. Akad. Wiss. Wien, Math-naturw. Kl.*, 103: 401.

WIESNER, J., 1897, Über die Ruheperiode und über einige Keimungsbedingungen der Samen von Viscum album. *Ber. dtsch. bot. Ges.*, 15: 503-516.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 355-359
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

ESTUDO DA AÇÃO DO SUCO DE FRUTO DO "SOLANUM LYCOPERSICUM" SOBRE CELULAS ANIMAIS [1]

A. OZORIO DE ALMEIDA, MARIO D. GOULART, MAURICIO IELPO e A. VIEIRA PINTO

Seção de Cancerologia, Fundação Gaffrée-Guinle, Rio de Janeiro, D. F.

Como vimos em uma memória aqui publicada, o suco de *Solanum lycopersicum* tem uma ação inhibidora sobre a germinação de sementes vegetais e sobre o crescimento das plantas, ação que não tem um carater específico, agindo o suco de uma fruta sobre as sementes de outras frutas. Nesse trabalho fomos levados a admitir a hipótese de que a ação inhibidora do suco de certas plantas tem o carater de uma ação de defesa do fruto em relação à semente, contra germens e micro-organismos que possam se desenvolver nesse meio ricamente nutritivo. Assim sendo, convem examinar a ação desses sucos, seja do fruto do *Sol. lycopersicum* sobre organismos uni-celulares bem como tambem sobre multi-celulares.

AÇÃO DO SUCO DO FRUTO DE *S. lycopersicum* SOBRE O *Paramecium caudatum*

1.ª Experiência — Usamos sempre culturas de *Paramecium caudatum* em infusão de alfafa. Em experiências preliminares verificamos que tomando volumes iguais de agua contendo *Paramecium* (chamamos "cultura de paramecium") e de suco de *S. lycopersicum*, colocada a mistura em vidro de relógio, sob o microscópio, observa-se a destruição imediata do *Paramecium*. O mesmo resultado se verifica quando se emprega o caldo de *S. lycopersicum* previamente neutralizado.

2.ª Experiência — Ação do suco de *S. lycopersicum* em diluições crescentes: As culturas são examinadas 48 horas após a mistura feita.

1 vol. de suco de *S. lycopersicum*, 4 de cultura de *Paramecium* (1/5): destruição total.
1 vol. de suco de *S. lycopersicum*, 9 de cultura de *Paramecium* (1/10): destruição total.
1 vol. de suco de *S. lycopersicum*, 19 de cultura de *Paramecium* (1/20): destruição total.
Testemunha: cultura rica.

---

[1] Recebido para publicação a 31 de Julho de 1941.
Trabalho executado na Fundação Gaffrée-Guinle, graças à generosidade do Dr. Guilherme Guinle.

3.ª Experiência — Diluições crescentes de suco puro de *S. lycopersicum* sobre o *Paramecium caudatum*.

Diluição de suco de tomate	*Resultado observado 48 horas mais tarde*
Testemunha	rica em *Paramecium*
1/50	ausência de *Paramecium*
1/100	rica
1/200	rica
1/500	rica
1/1000	rica

Chamaremos em todas as experiências deste trabalho diluição de suco de tomate a 1/50 ou 1/100 etc., as diluições que contêm 1 cc. de suco de tomate para 49 ou 99 cc. da cultura de *Paramecium*.

4.ª Experiência — Ação do suco puro de *S. lycopersicum* sobre o *Paramecium caudatum*.

Diluições do suco de tomate	*Observação dos resultados 48 horas mais tarde*
Testemunha	numerosos *Paramecium*
1/5	ausentes
1/10	ausentes
1/20	ausentes
1/50	ausentes
1/100	presentes
1/200	presentes
1/500	presentes
1/1000	presentes

O suco do fruto de *S. lycopersicum* tem reação ácida; por isso, nas experiências seguintes empregamos suco neutralizado pelo carbonato de sódio. As experiências foram conduzidas do mesmo modo que as anteriores.

5.ª Experiência — Ação do suco de tomate neutralizado sobre o *Paramecium*.

Testemunha	*Paramecium* ausentes
Diluição a 1/5	" "
Diluição a 1/10	" "
Diluição a 1/20	" "

6.ª Experiência — Ação do suco de tomate neutralizado sobre o *Paramecium*. Observação 48 horas depois.

Testemunha	*Paramecium* presentes
Diluição a 1/5	" ausentes
" a 1/10	" ausentes
" a 1/20	" ausentes
" a 1/50	" presentes
" a 1/100	" presentes
" a 1/200	" presentes
" a 1/500	" presentes
" a 1/1000	" presentes

Injeções intra-venosas de suco de tomate no coelho

Empregamos sempre o suco neutralizado pelo carbonato de sódio e filtrado em papel de filtro.

Coelho n.º 1 — Pêso 1770 grs. Injeção de 5 cc. de suco de tomate na veia marginal da orelha. Resultado: O animal nada apresentou de anormal.

Coelho n.º 2 — Coelho de 1970 grs. Injeções de 20 cc. de suco de tomate neutralizado na veia marginal da orelha. As injeções propositalmente são feitas normalmente, sem grande lentidão. As injeções se repetem diariamente.

Após a 1.ª injeção esboçou-se por instantes uma paresia do trem posterior do animal. Após a 2.ª injeção os fenômenos anteriores se acentuaram até paralisia do trem posterior, que se estendeu ao trem anterior e se dissipou após cerca de 10 segundos. Nada mais houve de anormal nas injeções posteriores a não ser na 18.ª injeção e na 20.ª injeção nas quais se repetiram os mesmos fenômenos observados nas duas primeiras injeções. Na 24.ª e última injeção, o coelho morreu com paralisia dos membros e opistótonos.

Ao todo o animal de 1970 gr. recebeu em 24 dias, por injeção intra-venosa, 480 cc. de suco de tomate neutralizado.

Ação do suco de tomate puro ou neutralizado sobre o crescimento de ratos

Tomamos 4 ratos da mesma ninhada e que foram conservados na mesma gaiola em idênticas condições de alimentação e de vida.

Esses ratos foram denominados A, B, C, e D. Os ratos C e D foram deixados como testemunhas; o rato (A) passou a receber diariamente uma injeção intra-peritonial de suco de tomate neutralizado pelo carbonato de sódio e filtrado em papel de filtro; o rato B recebeu o mesmo tratamento que (A) mas apenas com suco puro ácido (não neutralizado).

Eis o quadro do crescimento dos ratos: na coluna marcada dose está escrita a dose em centímetro cúbico de suco injetado no peritônio. Nas outras colunas acham-se os resultados da pesada dos ratos.

Dia	*Dose*	*Rato A: suco de tomate neutro*	*Rato B: suco de tomate ácido*	*Test 1*	*Test 2*
1	0,20	16,900	16,180	16,100	13,630
2	0,20	16,770	16,770	16,350	13,750
3	0,20	19,130	18,120	18,790	15,950
4	0,50	22,350	22,100	21,410	18,900
5	0,50	24,910	25,270	—	—
6	0,50	26,920	26,860	—	—
7	0,50	28,150	28,120	—	—
8	1,00	29,950	30,200	30,700	28,400
9	1,00	33,550	32,100	—	—
10	2,00	33,020	33,550	—	—
11	2,00	39,440	37,440	40,940	40,140
12	2,00	39,970	43,020	—	—
13	3,00	44,760	42,780	—	—
14	3,00	48,730	43,330	—	—
15	3,00	50,330	43,780	52,510	50,760
16	3,00	54,620	48,940	53,940	50,790
17	4,00	54,900	48,320	59,900	52,200
18	4,00	58,060	51,150	60,100	53,320
19	4,00	61,760	56,960	61,780	55,880
20	4,00	65,360	56,280	64,760	59,790
21	4,00	68,880	58,980	69,200	66,420

Ação das injeções de suco de tomate sobre o crescimento de tumores de enxerto em ratos

Em 5 ratos foi enxertado o sarcoma de Roffo, ha muito conservado em nosso serviço. Desses 5 ratos 2 foram deixados como testemunhas e 3 passaram a receber diariamente por injeção peritonial 2 cc. de suco de tomate neutralizado pelo carbonato de sódio.

As injeções de suco de tomate foram prolongadas por 29 dias até a morte do primeiro rato.

Nenhuma diferença sensivel poude ser observada entre os ratos tratados e as testemunhas, nem quanto ao enorme tamanho dos tumores, nem quanto ao aspecto microscópico das lâminas feitas com êles.

DISCUSSÃO

O suco de fruto de *Solanum lycopersicum,* quer em natureza, com reação ácida, quer convenientemente neutralizado, tem ação mortal sobre o *Paramecium caudatum,* até mesmo numa diluição de cerca de 1/50. Empregado em diluição a 1/2 a morte do *Paramecium* é imediata, e em diluições maiores até 1/50 é mais lenta e se faz em 1 a 2 dias.

Este resultado fala em favor da hipótese por nós aventada em um trabalho anterior deste mesmo número, que a ação inhibidora do crescimento e germinação é um meio de defesa do fruto e portanto da semente contra infusórios e germens que poderiam atacar o fruto, em vez de um meio fisiológico de retardar a época da germinação das sementes para ajustá-la com as estações do ano, conforme imaginaram Wiesner, Mollisch e Oppenheimer.

O suco de tomate não mostrou nenhuma ação retardadora do crescimento de ratos jovens submetidos às suas injeções, nem para com a multiplicação e crescimento de células de um sarcoma enxertado em ratos.

A toxidez do caldo mesmo em injeção intra-venosa no coelho é muito pequena, pois só na 24.ª injeção feita diariamente em um total de 480 cc. deu-se a morte de um coelho de 1970 gr. Esse fato torna tanto mais interessante a grande toxidez que apresenta o suco de tomate para com os infusórios; talvez assim se tenha uma primeira base para a compreensão do efeito observado no tratamento por maçãs raladas de infestações intestinais por parasitas dessa ordem.

RESUMO

O suco do fruto de *Solanum lycopersicum* puro ou neutralizado destroi o *Paramecium caudatum,* em diluições até de 1/50.

O suco neutralizado de *S. lycopersicum* é pouco tóxico para o coelho, mesmo em injeções intra-venosas.

O suco de *S. lycopersicum* em injeções intra-peritoniais diárias não modifica o crescimento de ratos e nem tambem o de tumores enxertados em ratos.

A ação destruidora do suco de *S. lycopersicum* sobre o *Paramecium caudatum* trás a primeira base, por nós aventada, de que exerce êle uma ação de defeza das sementes e do fruto contra a invasão de micro-organismos.

A ação destruidora que exerce o suco de *S. lycopersicum* sobre o *Paramecium caudatum* pode ser a primeira possibilidade de explicação para a ação curativa que exerce o regime alimentar de maçãs cruas contra infestações intestinais de amebas e outros parasitas.

SUMMARY

The juice of the fruit of *Solanum lycopersicum*, pure or neutralised, destroys *Paramecium caudatum*, in dilutions until 1/50.

In rabbits, the neutral juice of *Solanum lycopersicum* is little toxic, even in intra-venous injections.

Daily intra-peritonial injections of the juice of *Solanum lycopersicum* does not change the development of mice, the same being verified on tumours exerted in mice.

The destruction of *Paramecium caudatum* by the action of the juice of *Solanum lycopersicum* bring us a base, stated by us, that it has an effect as a defense of the seeds and fruits against the invasion of micro-organisms.

The destroing effect of the juice of *Solanum lycopersicum* on *Paramecium caudatum* leads us to the possibility of explain the healing action of dietary regims of raw apples, against intestinal infections of amoeba and other parasites.

Rev. Brasil. Biol., 1 (3): 361-364
Setembro, 1941 — Rio de Janeiro, D. F.

NOTICIAS E COMENTARIOS

HAROLD CLARKSON LLOYD, UM BENEMÉRITO

Com a publicação da fotografia de Harold Clarkson Lloyd e a da sepultura n.º 99, da quadra 37 do Cemitério da Consolação da cidade de São Paulo, onde repousam seus restos mortais, quer a REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA prestar pequena homenagem à memória de um benemérito incentivador da pesquisa científica em nosso país.

Harold Clarkson Lloyd, inglês de nascimento, viveu cerca de 15 anos no Brasil mantendo uma escola na cidade de S. Paulo onde lecionava inglês e datilografia. Era grande conhecedor do mundo, tendo

percorrido muitas terras, principalmente na África e nas Américas. Falecendo a 4 de Fevereiro de 1921 deixou todos os seus bens imoveis como legado ao Instituto Oswaldo Cruz, com a disposição clara de que fossem empregados *"exclusivamente* em estudos e trabalhos científicos que tenham por objeto a profilaxia e tratamento das molestias infecciosas".

Foi seu testamenteiro o professor Dr. Theophilo B. de Souza Carvalho, que teve a gentileza de nos fornecer as raras informações acima publicadas, acrescentando saber ainda que alguns bens existentes na Inglaterra foram legados a uma instituição científica local. Liquidado o inventário, deduzidas todas as despesas realizadas, resultou um saldo líquido de 219:224$500, na época uma pequena fortuna que, em apólices, foi incorporado ao patrimonio do Instituto Oswaldo Cruz.

Bem raras são, entre nós, doações a instituições científicas que vivem, em geral, com os recursos de verbas governamentais. Ao contrário, em outros países, são mais numerosas as organizações de ciência pura ou aplicada mantidas por particulares. Daí o realce da homenagem que, vinte anos depois de seu falecimento, desejamos prestar a Harold Clarkson Lloyd, que tão esclarecidamente compreendeu o sentido e a necessidade da pesquisa científica bem orientada e escolheu a instituição que iria beneficiar.

A REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA, divulgadora da pesquisa científica original nos varios setores da Biologia, e que é mantida principalmente graças a benemerência de Guilherme Guinle, cujo nome está estreitamente ligado a varias obras científicas no Brasil, reverencia a memória de Harold Clarkson Lloyd, apontando-o como exemplo a seguir.

1° Congresso da Associação Química do Brasil

Realizou-se em S. Paulo, entre os dias 21 e 26 de Julho, o 1.º Congresso da Associação Química do Brasil, sob a presidência do Dr. C. E. Nabuco de Araujo. O interesse despertado por este certame do qual participaram químicos de todo o Brasil, fala bem alto do sucesso atingido.

Nas reuniões científicas o número de trabalhos excedeu à espectativa, tendo sido apresentadas numerosas comunicações versando sobre os diversos ramos da química (inorgânica, analítica, orgânica, biológica). Fez-se representar a maioria das organizações de química do país além de numerosas Instituições particulares.

Perante auditório numeroso ouviram-se três conferências que despertaram grande interesse. A primeira foi proferida pelo Dr. Silvio Fróes de Abreu, do Instituto Nacional de Tecnologia, e versou sobre um problema de grande alcance patriótico como o da utilização das materias primas nacionais. Na segunda palestra falou o Prof. Fritz Feigl, sobre a técnica das reações de toque ("Tupfer-Reaktion"). Como se sabe, o prof. Feigl foi quem introduziu em microquímica este novo método sensivel de pesquisa hoje universalmente aceito. Esta palestra teve ainda maior originalidade porquanto o Prof. Feigl aproveitou a oportunidade para comunicar uma nova reação de sua autoria, descoberta no Laboratório da Produção Mineral, aplicada ao reconhecimento de iodo e que é a reação mais sensivel até hoje conhecida. As demonstrações práticas no correr da palestra ilustraram o desenrolar do tema. A última confe-

rência foi proferida pelo Dr. Mario da Silva Pinto, Diretor do Laboratório da Produção Mineral e teve por tema: "Erros e expressão de resultados analíticos". O conferencista frisou com muita clareza a importância do conhecimento dos erros, mesmo banais para que os resultados das análises tenham expressão científica. O Congresso proporcionou ainda aos diversos associados, excursões aos estabelecimentos industriais da Capital Paulista e que deixaram em todos a grata satisfação de ver que entre nós a química aplicada à Indústria já vai sendo compreendida graças ao espírito progressista que caracteriza os industriais paulistas.

O sucesso do 1.º Congresso da Associação Química do Brasil, será certamente um estímulo e um exemplo para todos aqueles que se dedicam aos diversos ramos da Química no Brasil.

G. G. V.

O **Prof. André Dreyfus,** da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de S. Paulo, realizou em Belo Horizonte um curso teórico-prático sobre Genética, em Junho último.

O **Prof. René Wurmser,** substituto na cadeira de Fisiologia, na Sorbonne, chegou ao Rio em Junho, contratado para o Laboratório de Biofisica da Faculdade Nacional de Medicina. O Prof. Wurmser veiu acompanhado de sua esposa, que tambem é sua colaboradora.

Ao **Prof. Rocha Lima,** diretor do Instituto Biológico de São Paulo, foi conferido o título de membro da Academia Pontificia de Ciências, com sede na cidade do Vaticano.

Ao **Prof. Rocha Lima,** por ocasião de seu 60.º aniversário natalício, é dedicado o volume 11 dos Arquivos do Instituto Biológico, distribuido no mês de Agosto, onde se encontra grande número de trabalhos de autoria de pesquisadores patrícios e estrangeiros.

A **Academia Brasileira de Ciências** empossou sua nova diretoria em sessão realizada na Escola Politécnica em 13 de Maio p. p. A nova diretoria é a seguinte: Arthur Moses, presidente; Francisco Radler de Aquino e Luciano Jacques de Moraes, vice-presidentes; Glycon de Paiva, secretário geral; Joaquim da Costa Ribeiro, 1.º secretário; Francisco de Oliveira Castro, 2.º secretário; Mario da Silva Pinto, tesoureiro.

O **Dr. Gilberto Villela,** foi re-eleito em 27 de Dezembro de 1940 membro da secção de Química, da American Association for the Advancement of Science.

O **Dr. Gilberto Villela,** chefe do laboratório de Bioquímica do Instituto Oswaldo Cruz, foi conferido o diploma de membro correspondente da "Asociación Bioquimica Argentina" em 3 de Julho p.p.

A **Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro** elegeu em sessão realizada em Junho p.p. a nova diretoria, cujo mandato deverá terminar em 10 de Janeiro de 1943, e que ficou assim constituida: Lauro Travassos, presidente; Genesio Pacheco, vice-presidente; J. F. Teixeira de Freitas, 1.º secretário; Gobert Araujo Costa, 2.º secretário; H. C. de Souza Araujo, tesoureiro; Arthur Neiva, Miguel Ozorio de Almeida e C. B. Magarinos Torres, membros da Comissão de Sindicância. Na mesma sessão teve lugar a discussão e aprovação dos novos estatutos.

A **John Simon Guggenheim Memorial Foundation** proclamou os nomes dos 20 cientistas e artistas latino-americanos aos quais concedeu bolsas de estudo e de viagem aos Estados Unidos da América, pelo prazo de um ano. Os 20 escolhidos são 8 do Brasil, 4 do México, 3 da Argentina, 2 do Uruguai, 2 de Porto Rico e 1 do Chile. Dos oito brasileiros, os que se destinam a investigações no campo das ciências biológicas, são os seguintes: Dr. Annibal Silveira, neurologista do Hospital de Juquerí, em S. Paulo, que estudará as atividades elétricas da cortex cerebral; Dr. Nilson Torres de Rezende, de Recife, que prosseguirá em seu estágio no serviço de neurofisiologia do Prof. J. F. Fulton, na Universidade de Yale; Dr. José Ribeiro do Valle, do Instituto de Butantan e da Escola Paulista de Medicina, que procederá a estudos de endocrinologia no laboratório do Prof. Evans; Dr. Mauricio Rocha e Silva, do Instituto Biológico de São Paulo, que fará estudos de química biológica no Instituto Rockefeller de Pesquisas Médicas, em New York; Dr. Otto Guilherme Bier, do Instituto Biológico de S. Paulo, que fará estudos de bioquímica com o Dr. Michael Heidelberger, na Universidade de Columbia; Dr. Agesilau Antonio Bittencourt, sub-diretor do Instituto Biológico de S. Paulo, que estudará virus de moléstias parasitárias de plantas cítricas com o Dr. H. S. Fawcett, da Estação Experimental de Citrologia da Universidade de California; e Dr. Edgar do Amaral Graner, da Escola Agrícola Luiz de Queiroz, de Piracicaba, S. Paulo, para estudar a citologia do milho e do fumo, com o Prof. T. H. Godspeed, da Universidade de California.

O **Prof. Carlos Chagas, filho,** da Faculdade Nacional de Medicina, foi eleito membro efetivo da Academia Brasileira de Ciências, secção de Ciências Físico-Químicas.

O **Prof. Ernest C. Faust,** da Universidade de Tulane, Nova Orleans, esteve de passagem no Rio de Janeiro, a 8 de Agosto p.p., onde visitou a Fundação Rockefeller e o Instituto Oswaldo Cruz.

O **Prof. Samuel B. Pessôa,** da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo, realizou em 11 de Agosto p.p., na Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro, uma conferência sobre as realizações da Comissão de Estudos ao Combate da Leishmaniose no Estado de São Paulo.